

SÉRIE , N°

N° D'ORDRE :

146

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jean DEBIESSE

Agrégé de Physique,
Professeur au Lycée Carnot de Tunis.

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION PHYSICO-CHIMIQUE A L'ÉTUDE DU MÉTABOLISME DU BACILLE TUBERCULEUX B.C.G.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 5 Juillet 1939 devant la Commission d'examen.

MM. MEUNIER *Président.*

CARDOT
DÉJARDIN } *Examineurs.*

IMPRIMERIE BASCONE & MUSCAT
41, AVENUE DE LONDRES
TUNIS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

SÉRIE , N°
N° D'ORDRE :

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jean DEBIESSE

Agrégé de Physique,
Professeur au Lycée Carnot de Tunis.

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION PHYSICO-CHIMIQUE A L'ÉTUDE DU MÉTABOLISME DU BACILLE TUBERCULEUX B.C.G.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le Juillet 1939 devant la Commission d'examen.

MM. MEUNIER	Président.
CARDOT	} Examinateurs.
DÉJARDIN	

IMPRIMERIE BASCONE & MUSCAT
41, AVENUE DE LONDRES
TUNIS



CONTRIBUTION PHYSICO-CHIMIQUE
A L'ÉTUDE DU MÉTABOLISME
DU BACILLE TUBERCULEUX B. C. G.

UNIVERSITÉ DE LYON - FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen honoraire

M. LONGCHAMBON, *, **, I., †.

Doyen

M. R. DOUIN, *, **, I.

Assesseur

M. VANEY, *, I., †.

Professeurs honoraires

MM. VESSIOT, C. *, I.

RIGOLLOT, *, I.

COUTURIER, *, I., †.

Professeurs

MM. DULAC, *, I., *Calcul différentiel et intégral.*

DOUIN, *, **, I., *Botanique.*

MEUNIER, O. *, I., *Chimie industrielle.*

SIRE, *, I., †, *Mécanique rationnelle et appliquée.*

VANEY, *, I., †, *Zoologie.*

CARDOT, *, I., *Physiologie générale.*

ROMAN, *, I., *Géologie.*

LOCQUIN, *, I., *Chimie générale.*

LONGCHAMBON, *, **, I., †, *Minéralogie.*

DÉJARDIN, *, I., *Physique générale.*

SOLLAUD, I., *Zoologie.*

THIBAUD, A., *Physique expérimentale.*

LEMARCHANDS, *, I., *Chimie appliquée.*

EYRAUD, I., *Mathématiques.*

FROMAGEOT, A., *Chimie biologique.*

AUMÉRAS, A., *Chimie physique.*

Maîtres de conférences et chargés de cours

MM. DŒUVRE, I., *Chimie organique.*

PRETTRE, *Chimie.*

KUHNER, *Botanique.*

LAVAL, *Minéralogie.*

Maîtres de conférences adjoints

MM. BONNET, *, I., *Zoologie générale et agricole.*

Chargés de cours complémentaires

Mlle BACHRACH, I., *Physiologie.*

MM. DUFAY, I., *Astronomie et Physique supérieure.*

VIRET, I., *Etude des roches.*

RANSON, *, *Géométrie supérieure.*

TRONCHET, A., *Botanique.*

MAYET, *, I., †, *Anthropologie.*

PELOSSE, I., *Sériciculture.*

DARESTE DE LA CHAVANNE, I., *Géographie physique.*

SEYEWETZ, *, I., *Matières colorantes artificielles.*

Secrétaire

M. ROUX, A.

A MA FEMME

A MES ENFANTS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR GEORGES DÉJARDIN

A MONSIEUR LE DOCTEUR ÉTIENNE BURNET

Hommage respectueux.

par **Jean DEBIESSE**

Chapitre I : Matériel et technique	3
Spectrographes	3
Sources	3
Cuves d'absorption	4
Plaques utilisées. Étude des clichés	5
Liquides absorbants	5
 Chapitre II : Culture microbienne et interprétation des résultats ...	7
1° Préparation et étude générale des cultures microbiennes	7
2° Essai d'interprétation	9
1 ^{re} hypothèse	10
2 ^e hypothèse	11
A. Influence des produits métaboliques	12
B. Influence de l'espace occupé	12
C. Influence de la nourriture	16
Remarque	17
 Chapitre III : Spectres d'absorption de liquides de Sauton ense-	
mencés avec le B.C.G.	21
 Génération de la méthode des spectres d'absorption	23

2^e PARTIE : ÉTUDE CHIMIQUE

Chapitre IV : Échanges gazeux	27
1 ^o Diminution de la masse totale des ballons ensemencés pendant leur séjour à l'étuve à 37° C.	27
Ballons témoins	28
Ballons ensemencés	29
2 ^o Étude qualitative des échanges gazeux	29
Vapeur d'eau	29
Hydrogène sulfuré	29
Anhydride carbonique	30
Ammoniac et amine	30
3 ^o Études quantitatives	30
Remarque	32
Premiers résultats	32
Remarque 1.	34
Remarque 2.	34
Remarque 3.	34
Résultats généraux	34
Remarque	35
Chapitre V : Évolution du pH	36
Chapitre VI : Évolution de la concentration des ions SO_4^{4-} et PO_4^{3-}	38
a) Ion SO_4^{4-}	38
b) Ion PO_4^{3-} : titrage de la solution de nitrate d'uranium	39
titrage de l'ion PO_4^{3-}	39
Chapitre VII : Consommation de l'acide citrique et du glycérol	41
1 ^o Acide citrique	41
Remarque	42
Résultats	42
2 ^o Glycérol	42
A) Méthode de Laborde	42
B) Méthode de Nieloux ou méthode chromométrique	43
C) Interprétation	46
D) Point de vue énergétique	46
E) Interprétation quant aux échanges gazeux	48

Chapitre VIII : Alimentation azotée : asparagine et ammoniac	49
1° Étude de l'azote total par la méthode de Kjeldahl-Bertrand ...	50
a) Précision des résultats obtenus	50
b) Étude d'un produit azoté connu	51
2° Étude de la méthode de Maquenne	52
3° Traitement à la chaux, puis méthode de Maquenne	53
4° Étude, en fonction du temps, des substances azotées du Sauton	53
Remarque	54
a) Interprétation des résultats	54
b) Azote total des microbes	56
c) Échanges azotés	58
5° Perte d'azote dans les ballons	59
Chapitre IX : Étude des produits formés dans le Sauton	61
1° Acides : essais de précipitation	61
a) Précipitation au mercure	61
Résultats	62
Recherche des protéines	63
b) Précipitation au calcium	64
Résultats	65
c) Recherche des acides formés	66
d) Étude qualitative des précipités ou des colorations obtenues	
avec une solution saturée d'acétate de cuivre	67
2° Formation d'une substance réductrice. Étude de cette substance	68
a) Nature	68
b) Étude quantitative	70
Chapitre X : Interprétation chimique des résultats précédents	71
1° Période de développement microbien	72
Bilan des 4 éléments principaux :	74
Carbone	74
Hydrogène	74
Azote	74
Oxygène	74
Étude de chacun des constituants du Sauton pendant la pre-	
mière période de 28 jours	75
2° Période d'entretien microbien	78

3^e PARTIE.

Chapitre XI : Interprétation chimique des spectres d'absorption ...	79
1 ^o Étude de l'absorption des constituants du liquide de Sauton	79
2 ^o Étude du Sauton	80
3 ^o Étude du seuil d'absorption	80
4 ^o Évolution du seuil d'absorption au cours du développement du B.C.G.	81
5 ^o Étude de l'asparagine	82
6 ^o Évolution de la bande 4860-4600	84
7 ^o Essai de justification des théories précédentes	85

CONCLUSION.

Introduction

L'étude directe de l'évolution chimique d'un milieu de culture, sous l'influence de la vie microbienne, présente d'assez grandes difficultés. La complexité du milieu d'une part, et, d'autre part, la concentration relativement faible des divers constituants, rendent les analyses chimiques longues et délicates. En effectuant celles-ci, on risque en outre de détruire des substances plus ou moins stables.

La méthode des spectres d'absorption permet de suivre l'évolution du milieu d'une façon beaucoup plus sûre et plus rapide.

Après élimination des microbes par filtration, le spectre d'absorption traduit et révèle plus ou moins nettement les modifications chimiques dont le milieu a été le siège.

Afin de pouvoir interpréter correctement les modifications observées du spectre d'absorption, j'ai utilisé un liquide nutritif de composition chimique initiale bien définie, *le liquide de Sauton*.

Sa composition est la suivante :

Asparagine	4 g.
Acide citrique	2 g
Glycérol	60 g.
Phosphate bipotassique	0,5 g.
Sulfate de magnésium	0,5 g.
Citrate de fer ammoniacal	0,05 g.
Aminoniaque à 20 %, 3 cm ³ , soit NH ³	0,7 g.
Eau	940 g.

J'aiensemencé le milieu de *Sauton*, de pH colorimétrique 7,2, avec une espèce microbienne bien définie, le bacille tuberculeux B.C.G. de l'Institut Pasteur de Paris.

J'ai étudié les spectres d'absorption fournis successivement par le milieu au cours de son évolution en fonction du temps, ainsi que les modifications chimiques correspondantes.

Le présent travail a été effectué à l'Institut Pasteur de Tunis dont le Directeur, M. le D^r Burnet, a bien voulu m'accueillir et me guider dans la partie microbiologique de mes recherches; au laboratoire de l'Institut de Physique Générale de Lyon, où mon maître, M. le Professeur Déjardin, a dirigé toutes mes recherches physiques, enfin au laboratoire de physique du Service Botanique de Tunis obligeamment mis à ma disposition par son Directeur, M. Chabrolin. M. le Professeur Meunier a dirigé mes travaux en chimie.

Mes amis MM. Bance et Montlaur, chefs de laboratoires à Tunis, dont j'ai utilisé les installations, ont souvent collaboré à mon travail.

Enfin le D^r Paul Durand a présidé à tous mes ensemencements microbiens et m'a fait bénéficier maintes fois de ses conseils judicieux.

I^{re} Partie

Étude physique

CHAPITRE I

MATÉRIEL ET TECHNIQUE

Spectrographes. — Mes observations spectrographiques s'étendent sur l'intervalle 8.000-2.000 Å. Elles ont nécessité l'emploi de deux instruments : un spectrographe de Féry « grand modèle » à optique de quartz et un spectrographe à champ d'image plan de la Société Générale d'Optique.

Le premier convient pour l'étude de la région ultra-violet 2.500 à 4.300 Å, la dispersion linéaire sur les clichés varie de 6 à 33 Å par millimètre.

Le second appareil, ouvert à F/8, permet d'explorer dans d'excellentes conditions le spectre visible dans l'étendue duquel la dispersion obtenue varie de 13 Å par millimètre (4.000 Å) à 100 Å par millimètre (8.000 Å).

Sources. — Comme source d'émission continue dans l'ultra-violet, j'ai utilisé la lampe à hydrogène de Chalonge et Lambrey (modèle Dunoyer) fonctionnant sous régime contrôlé, l'intensité du courant secondaire étant égale à 100 mA. Cette lampe permet d'obtenir, avec une grande intensité, le spectre continu moléculaire de l'hydrogène, dont les caractères sont actuellement bien connus (1).

Pour l'étude du spectre visible, j'ai employé une lampe à incandescence (100 watts), toutes les précautions étant prises pour assurer l'invariabilité du rayonnement au cours des différentes poses. (La température de couleur du filament de tungstène étant voisine de 2.740° K.)

Dans les deux cas, les longueurs d'onde ont été soigneusement repérées en utilisant comme spectre de comparaison, soit celui d'une lampe à mercure en quartz, soit celui de l'arc au fer.

Cuves d'absorption. — Les liquides étudiés, parfaitement limpides après filtration, étaient placés dans des cuves de Schebe. Ces cuves cylindriques, en verre, sont obturées par 2 plaquettes de quartz de 0 mm. 9 d'épaisseur. J'ai utilisé le plus souvent des cuves ayant pour épaisseur 39 mm. (étude du spectre visible), ou 5 mm. (étude de l'ultra-violet).

Deux causes d'erreurs interviennent dans l'étude de l'absorption : d'une part, les réflexions sur les parois extérieures de la cuve, et, d'autre part, les réflexions sur les surfaces qui séparent le quartz du liquide. L'influence des premières se trouve éliminée lorsqu'on opère par comparaison avec une cuve témoin identique, quant aux autres, on peut se rendre compte de leur importance, en appliquant la formule de Fresnel, qui donne le facteur de réflexion dans ces conditions :

$$\rho = \left(\frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2} \right)^2$$

avec $\left\{ \begin{array}{l} n_1 \text{ indice du liquide} \\ n_2 \text{ indice du quartz} \end{array} \right.$

L'indice du Sauton varie très peu au cours de la culture du B.C.G. (2 unités de la 3^e décimale). En prenant pour indice du quartz 1,55; pour indice moyen du liquide 1,38.

$$\rho = \left(\frac{0,17}{2,93} \right)^2 \approx \frac{3}{8000} \approx 0,0004$$

Ainsi, étant donné le but poursuivi, la réflexion sur les faces internes n'entraîne qu'une perte de flux absolument négligeable.

Plaques utilisées : étude des clichés. — Avec les deux spectrographes mentionnés ci-dessus j'ai utilisé divers films et plaques panchromatique (films Zeiss, Agfa, Kodak, plaques Lumière, etc.).

Afin d'éviter toute confusion entre les bandes d'absorption du liquide étudié et les variations d'impression dues à la sensibilité spectrale des plaques, j'ai repris fréquemment la même étude en employant successivement différentes émulsions. La persistance d'une bande sur tous les clichés montrait qu'elle appartenait bien au spectre d'absorption du liquide.

Dans la plupart des cas, mes clichés ont été examinés à l'aide du microdensimètre enregistreur de J. F. Thovert (2). Cet appareil de fonctionnement rapide et suffisamment fidèle, m'a permis de mettre en évidence tous les faits essentiels. Toutefois, certaines régions intéressantes des spectrogrammes ont été étudiées plus complètement au moyen du microphotomètre enregistreur de D. Chalonge (3).

Une bande d'absorption se traduit sur les diagrammes par un minimum de la courbe tracée par le spot du microphotomètre.

Liquides absorbants. — J'ai étudié l'absorption des divers milieux liquides après filtration sur des bougies Chamberland L₂, afin d'éliminer les microbes. J'ai pu observer que le liquide de Sauton nonensemencé, présente rigoureusement le même spectre après et avant une telle filtration.

D'autre part, j'ai été amené, au cours de mon travail, à conserver des bouillons filtrés dans une glacière afin d'éviter leur altération. J'ai vérifié qu'après retour à la température ordinaire, un certain bouillon présente le même spectre d'absorption qu'avant refroidissement. Ayant utilisé surtout le spectrographe de Féry, celui-ci me permettait d'obtenir, sur chaque cliché, 10 spectrogrammes, correspondant par exemple aux conditions suivantes :

Spectre n°	Liquides absorbants	Sources	Epaisseur	Fente	Temps de pose
1	Eau distillée	Lampe à incandescence Philips	39 $\frac{m}{m}$	1/20 $\frac{m}{m}$	2 minutes
2	Sauton témoin	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—
4	Sauton après <i>n</i> jours de culture de B.C.G.	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—
6	—	Lampe à H ²	5 $\frac{m}{m}$	1/40 $\frac{m}{m}$	8 minutes
7	—	—	—	—	—
8	Sauton témoin	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—
10	Eau distillée	—	—	—	—

Un même cliché me permettait ainsi d'examiner comparative-
ment :

- 1° le spectre obtenu à travers l'eau;
- 2° le spectre obtenu à travers le liquide témoin;
- 3° le spectre obtenu à travers le liquide de Sauton après *n* jours
de culture de B.C.G., puis filtré.

J'ai photographié également sur un même cliché des spectres
de liquides de Sauton après 7, 14, 21 et 28 jours de culture de
B.C.G. afin de me rendre compte, d'après la suite des spectres d'ab-
sorption, de l'évolution complète du milieu.

Enfin pour éliminer les risques d'erreurs provenant d'une évo-
lution singulière d'un liquide de Sautonensemencé avec le B.C.G.,
j'ai toujours opéré sur le mélange des produits de filtration de
plusieurs ballons (3 au moins) cultivés dans les mêmes conditions.
J'obtenais ainsi un liquide moyen dont j'étudiais le spectre d'ab-
sorption.

CHAPITRE II

CULTURE MICROBIENNE ET INTERPRÉTATION

DES RÉSULTATS

I. — Préparation et étude générale des cultures microbiennes

J'ai étudié la croissance des cultures microbiennes de B.C.G. en opérant de la manière suivante : 24 ballons de pyrex de 750 cm³ reçoivent chacun 300 cm³ de liquide Sauton de pH = 7,2. Ces ballons passent à l'autoclave où ils perdent 25 à 28 g. d'eau. Ils sont pesés, et 18 d'entre eux sontensemencés exactement dans les mêmes conditions, avec la souche microbienne du bacille tuberculeux B.C.G. de l'Institut Pasteur de Paris. Les 18 ballonsensemencés et les 6 témoins sont placés dans une étuve à 37° C. On obtient ainsi 6 séries formées, chacune, de 3 ballonsensemencés, et de 1 ballon nonensemencé. Une culture « en voile » se développe dans les ballonsensemencés; le voile recouvre toute la surface du liquide au bout de 10 à 12 jours. Chaque semaine, on retire de l'étuve une série de 4 ballons; on les pèse pour se rendre compte des échanges gazeux.

Les milieux fertiles sont filtrés sur papier (filtres pesés et équilibrés) et leurs filtrats mélangés. Le liquide ainsi obtenu, après passage sur bougie Chamberland, est conservé pour les opérations spectroscopiques et chimiques; d'autre part, les microbes sont lavés à l'eau distillée, puis séchés à l'étuve à 90° C. pendant une durée suffisante (6 heures) pour obtenir une masse constante. Une pesée donne alors la quantité de microbes desséchés.

L'évolution de la masse de microbes secs rapportés à 1 litre de

liquide de Sauton, en fonction de la durée de la culture, est donnée par le tableau suivant :

Temps en jours	7	14	21	28	35	42
Masse de mi- crobes secs en grammes	0,41 0,32 0,36 0,39	3,11 3,80 3,74 3,31	8,67 8,01 8,68 8,92	12,83 13,18 14,07 13,40	13,97 13,50 14,03 13,08	14,21 14,24 13,37 13,89
Moyennes	0,37	3,49	8,57	13,37	13,67	13,89

La courbe moyenne (fig. 1) représentant les variations de la masse de microbes desséchés se compose de 2 segments courbes au début et à la fin de la culture et d'une portion rectiligne importante entre le 14^e et le 28^e jour de la culture. On constate que le rendement microbien est élevé; il correspond au rendement obtenu par Sauton lui-même (4).

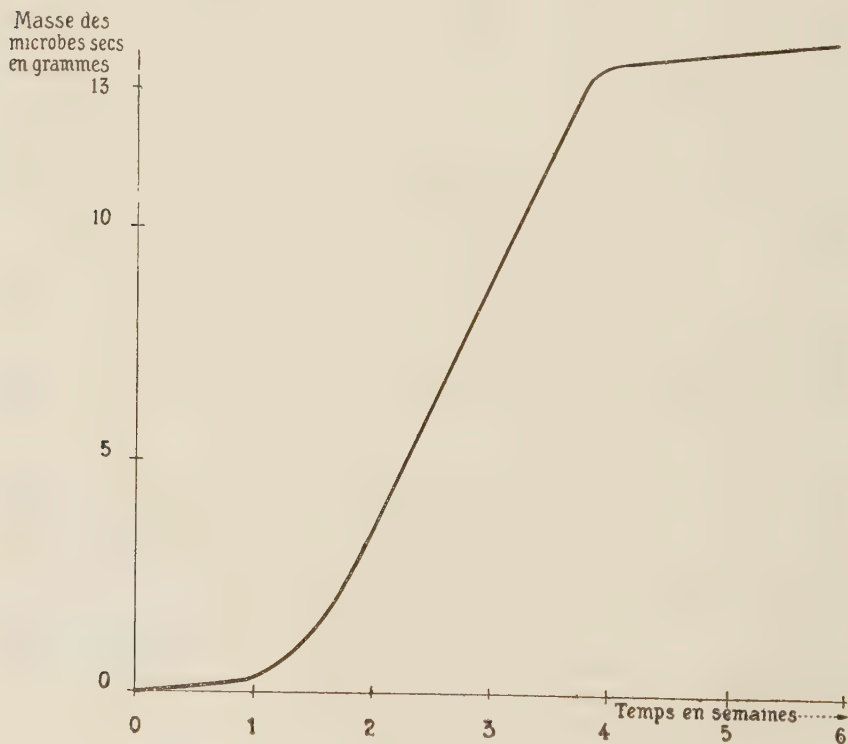


FIG. 1. — Masse de microbes en fonction du temps.

Dans la masse microbienne, il y a des microbes jeunes et des microbes vieux, ainsi que des microbes morts, en cours de disparition par lyse.

Si l'on néglige ces derniers, la courbe obtenue représente la colonie microbienne en cours de développement, colonie qui comprend environ 10^{12} microbes par ballon.

II. — Essai d'interprétation

Désignons par p la masse en grammes des microbes secs au temps t ; par $p + dp$ la masse en grammes des microbes secs au temps $t + dt$.

Pendant l'intervalle de temps dt , des microbes sont morts et ont disparu par lyse et, d'autre part, des microbes sont nés. Dans l'intervalle de temps dt , le nombre des naissances et celui des décès sont proportionnels à la fois au nombre d'individus et à l'intervalle dt ; or, à un facteur constant près (qui est la masse moyenne d'un microbe) p représente le nombre de microbes.

Si M est le coefficient de natalité,

Si N est le coefficient de mortalité,

la variation dp du nombre des microbes pendant le temps dt est donnée par la différence entre le nombre des microbes morts et celui des microbes nés, ce qui peut s'exprimer par une relation de la forme :

$$(1) \quad \begin{aligned} dp &= Npdt - Mpdt, & \text{d'où} \\ \frac{dp}{dt} &= Np(t) - Mp(t) \end{aligned}$$

Les coefficients N et M ne sont pas constants et dépendent notamment de p et de t . La natalité N décroît et la mortalité M croît avec l'accroissement de la population, ce qui peut se traduire approximativement par les équations :

$$(2) \quad N = n - \nu p \qquad M = m + \mu p$$

Equations dans lesquelles n , m , ν et μ sont les coefficients et les facteurs vitaux,

n est le coefficient intrinsèque de natalité.

m est le coefficient limitatif de mortalité.

v est le facteur intrinsèque de natalité.

μ est le facteur complémentaire de mortalité.

En posant :

$$\begin{aligned}\Sigma &= n - m \\ h &= v + \mu\end{aligned}$$

Σ étant le coefficient de multiplication,

h étant le facteur de mortalité, l'équation s'écrit finalement :

$$(3) \quad \frac{dp}{dt} = \Sigma p(t) - hp^2(t)$$

C'est l'équation logistique de Verhulst dans le cas d'une population vivant en colonie fermée. Il suffit d'intégrer l'équation (3) pour obtenir : $p = f(t)$.

En fait les coefficients et facteurs vitaux dépendent d'un grand nombre de variables (aliments, espace disponible, température, etc.) et l'équation (3) ne peut être intégrée que dans des cas particulièrement simples.

PREMIÈRE HYPOTHÈSE :

Les coefficients et facteurs vitaux sont constants. L'équation peut s'écrire :

$$\frac{dp}{dt} = hp \left(\frac{\Sigma}{h} - p \right) \quad \text{si} \quad \frac{\Sigma}{h} = \omega$$

$$\frac{dp}{dt} = hp (\omega - p)$$

$$\frac{\omega \cdot dp}{p (\omega - p)} = \Sigma dt$$

$$(4) \quad \Sigma dt = \left(\frac{1}{p} + \frac{1}{(\omega - p)} \right) dp$$

En intégrant pour $p_0 < \omega$

$$(5) \quad p = \frac{\omega p_0}{p_0 + (\omega - p_0) \cdot e^{-\Sigma t}}$$

Quand t tend vers l'infini, p , masse des microbes secs, tend vers la valeur limite ω qui ne dépend que des coefficients et facteurs vitaux. Ainsi en ce qui concerne mes expériences, l'équation logistique représente bien l'évolution microbienne observée, la limite étant égale à environ 13,9 g. de microbes secs par litre de Sauton. L'équation (5) peut se transformer ainsi :

$$p = \frac{\omega}{1 + \left(\frac{\omega}{p_0} - 1 \right) e^{-\Sigma t}} = \frac{A}{1 + B e^{-\Sigma t}}$$

Au bout de 6 semaines, p est sensiblement constant et égal à 13,9, par suite $A = 13,9$. D'après les valeurs numériques obtenues pour p à la fin de la 1^{re} et de la 2^e semaine, les valeurs de Σ et de B sont :

$\Sigma = 2,5$ et $B = 450$, et l'équation précédente devient :

$$(6) \quad p = \frac{13,9}{1 + 450.e^{-2,5.t}}$$

t étant exprimé en semaines.

Le tableau suivant permet la comparaison entre les valeurs calculées à l'aide de cette formule et les valeurs trouvées expérimentalement :

Temps	1	2	3	4	5	6
	—	—	—	—	—	—
Valeurs expérimentales	0,37	3,49	8,57	13,37	13,67	13,89
Valeurs calculées	0,36	3,49	11,29	13,6	13,9	13,9

Ainsi, dès la 3^e semaine, l'équation logistique donne des résultats trop forts.

DEUXIÈME HYPOTHÈSE :

Il faut donc tenir compte de la variation des coefficients et facteurs vitaux. Ceux-ci dépendent notamment des produits formés par les microbes, de l'espace occupé par eux et de la nourriture.

A) *Influence des produits métaboliques.* — Les microbes peuvent sécréter des produits toxiques dont l'accumulation dans le milieu diminue la natalité et augmente la mortalité. Pour représenter une action de ce genre, Volterra (5) a fait intervenir un terme intégral négatif dans l'équation logistique. Il a obtenu ainsi l'équation suivante :

$$\frac{dp}{dt} = \Sigma p(t) - h p^2(t) - c p(t) \int_0^t K(t - T) p(T).dT$$

dans laquelle la fonction $(t-T)$ est décroissante. Simplifiée en posant $K(t-T) = 1$ et intégrée par Volterra, cette équation a pour solution les 2 équations suivantes qui donnent p et t en fonction d'un paramètre P :

$$(a) \quad p = \left(p_0 - \frac{\Sigma}{h} - \frac{C}{h^2} \right) . e^{-hP} + \frac{\Sigma}{h} + \frac{C}{h^2} - \frac{C}{h} . P = F(P)$$

$$(b) \quad t = \int_0^F \frac{ds}{F(s)}$$

La relation (a) s'annule pour une valeur finie de P qui correspond à t infini.

Au total, la population microbienne s'annulerait au bout d'un temps très grand, après avoir passé par un maximum. Je n'ai rien observé de tel dans le cas des cultures de B.C.G. dont la masse tendait au contraire vers une limite finie, 13,9 g., sans passer par un maximum. Je puis donc en conclure, dans la mesure où la théorie de Volterra est correcte, que les produits métaboliques sécrétés n'exercent pas pour les microbes B.C.G. un effet toxique appréciable dans les limites de temps et les conditions des cultures.

REMARQUE :

Les produits sécrétés sont sûrement plus ou moins toxiques. Mais le développement se limitant pour les raisons indiquées plus loin, la concentration limite de ces produits dans le milieu reste au-dessous d'une valeur liminaire offensive.

B) *Influence de l'espace occupé.* — Au cours de mes expériences, j'ai constaté que le voile microbien s'étend progressivement

sur la surface libre du liquide et qu'il occupe complètement cette surface au bout de 12 à 15 jours (surface libre de chaque ballon 90 cm²). Avant qu'il en soit ainsi, il est probable que les microbes ne se gênent pas mutuellement. Après 15 jours, le voile s'épaissit, se ride et se développe même sur la paroi de verre des ballons à laquelle il adhère sur 1 à 1,5 cm. de hauteur.

Chaque microbe doit incommoder ses voisins. Après sa mort, et jusqu'à désagrégation complète, il occupe un certain espace, en gênant le développement des microbes suivants. On peut alors envisager deux hypothèses :

a) l'influence due aux microbes morts persiste indéfiniment;

b) au contraire, un microbe mort se désagrège complètement et l'espace occupé par lui redevient disponible.

La théorie de ces phénomènes, que nous allons exposer, est due à V. A. Kostitzin (6).

Désignons par s l'espace, rapporté à l'unité de volume, occupé par les microbes vivants ou morts, α étant le volume d'un microbe vivant et β le volume d'un microbe mort.

Supposons que la natalité soit proportionnelle à p et à l'espace disponible ($1-s$) et que la mortalité soit proportionnelle à p et à s . Considérons comme négligeable l'action des autres facteurs limitatifs. Plaçons-nous enfin dans le cas de la 1^{re} hypothèse : β constant.

L'équation logistique devient alors :

$$(7) \quad \frac{dp}{dt} = pn(1-s) - m.p.s. - hp^2$$

D'autre part, le volume total étant occupé par les microbes morts et les microbes vivants :

$$s = p\alpha + m\beta \int_0^1 p(u)s(u) du$$

Le calcul a été développé complètement par Kostitzin.

La différentiation de l'équation précédente donne :

$$s' = \alpha p' + m\beta p s,$$

mais en tenant compte de l'équation (7), l'équation précédente devient :

$$(8) \quad s' = p [a n - s (a n + \alpha m - \beta m) - h \alpha p]$$

Éliminons le temps t des équations (7) et (8) :

$$(9) \quad \frac{dp}{ds} = \frac{n - (m + n) s - hp}{a n - h \alpha p - s [a n + \alpha m - \beta m]}$$

Soit z une nouvelle variable telle que :

$$z = \frac{n - hp}{hs}$$

$$\frac{dp}{ds} = -z - s \frac{dz}{ds}$$

Le numérateur dans l'équation (9) devient :

$$n - (m + n) s - hp = s (hz - m - n),$$

Le dénominateur prend la forme :

$$a n - h \alpha p - s (a n + \alpha m - \beta m) = s (a h z - \alpha n - \alpha m + \beta m)$$

Posons :

$$F(z) = a h z^2 + z (h - \alpha n - \alpha m + \beta m) - (m + n)$$

L'équation (9) peut alors être intégrée.

$$(10) \quad \frac{ds}{s} = - \frac{\alpha h z - \alpha n - \alpha m + \beta m}{F(z)} dz$$

Le polynôme $F(z)$ s'annule pour deux valeurs de z : z_1 et z_2 .

En posant :

$$A_1 = \frac{1 + \alpha z_2}{\alpha (z_2 - z_1)} \quad A_2 = \frac{1 + \alpha z_1}{\alpha (z_1 - z_2)}$$

Tous calculs faits Kostitzin trouve 3 équations paramétriques qui permettent de trouver $p = f(t)$.

2 cas sont à envisager :

$$1^{\circ} z_0 > z_2$$

$$s = s_0 \left(\frac{z_0 - z_1}{z - z_1} \right) \cdot \left(\frac{z_0 - z_2}{z - z_2} \right) A_2$$

$$p = \frac{n}{h} - z s_0 \left(\frac{z_0 - z_1}{z - z_1} \right) \cdot \left(\frac{z_0 - z_2}{z - z_2} \right) A_2$$

$$t = \int_z^{z_0} \frac{du}{\alpha h (u - z_1) (u - z_2) \left(\frac{n}{h} - u s_0 \left(\frac{z_0 - z_1}{u - z_1} \right) \cdot \left(\frac{z_0 - z_2}{u - z_2} \right) A_2 \right)}$$

Dans ce cas, l'espace occupé par les microbes s'accroît de plus en plus, la population passe par un maximum et décroît ensuite.

$$2^{\circ} z_0 < z_1 < z_2$$

$$s = s_0 \left(\frac{z_0 - z_1}{z - z_1} \right) \cdot \left(\frac{z_2 - z_0}{z_2 - z} \right) A_2$$

$$p = \frac{n}{h} - s_0 z \left(\frac{z_0 - z_1}{z - z_1} \right) \cdot \left(\frac{z_2 - z_0}{z_2 - z} \right) A_2$$

$$t = \frac{1}{\alpha h} \int_0^z \frac{du}{(z_2 - u) (u - z_1) p(u)}$$

L'espace occupé peut passer par un minimum et augmente ensuite, mais la population tend encore vers une disparition totale.

L'hypothèse précédente conduit dans les deux cas à des conclusions nettement différentes des résultats de l'expérience. J'ai observé, en effet, une croissance continue des masses microbiennes, précédant un état stationnaire. L'espace occupé par les microbes de un litre de Sauton tendait de même vers un volume limite d'environ 300 cm³ pour les microbes frais. L'hypothèse $\beta = \text{constante}$ doit donc être rejetée.

Admettons, au contraire, la possibilité d'une désagrégation des

microbes morts, l'espace occupé par eux redevenant disponible au bout d'un certain temps. Nous pouvons alors représenter le volume d'un microbe mort par une relation du type :

$$p = a e^{\sigma(t-T)}$$

dans laquelle $t - T$ désigne le temps écoulé depuis la mort du microbe. L'équation de la vitesse du développement microbien reste la même que précédemment, soit :

$$p' = pn(1 - s) - mp - hp^2,$$

mais l'équation du volume occupé par les microbes devient :

$$s = ap + m a \int_0^t p(u) s(u) e^{\sigma(u-t)} du$$

Kostitzin trouve que, dans ce cas, le développement microbien tend vers un état stationnaire stable $p_e S_e$ vérifiant les équations :

$$\begin{aligned} n - (m + n) s - hp &= 0 \\ -\sigma s + a p (\sigma + n - ns - hp) &= 0 \end{aligned}$$

C'est précisément un tel état qui se manifeste dans mes observations; il faut donc admettre qu'une lyse des microbes morts libère constamment l'espace qu'ils occupent.

C) *Influence de la nourriture.* — Il faut remarquer que celle-ci a toujours été en excès dans les cultures étudiées par moi. J'ai constaté, par des analyses chimiques, que les microbes avaient consommé, en six semaines, à peu près la moitié des substances initialement contenues dans les ballons ensemencés.

Mais les coefficients et facteurs vitaux dépendent de la « ration quotidienne », ration qui diminue évidemment à mesure que la colonie microbienne se développe. Les travaux de Gause (7) sur le *Paramecium caudatum* et le *Paramecium aurelia* ont montré, en effet, que le coefficient de multiplication est relativement stable par rapport à la nourriture, tandis que le facteur de mortalité h est inversement proportionnel à la ration quotidienne.

Dans mes ballons fermés, la ration varie évidemment en raison

inverse du nombre, et, par suite, de la masse des microbes secs. Il en résulte que le facteur limitatif h doit être une fonction linéaire de la masse des microbes secs, c'est-à-dire qu'il doit être de la forme :

$$(11) \quad h = h_0 + a p$$

REMARQUE :

p étant exprimé, comme je l'ai fait jusqu'ici, en grammes de microbes secs, a doit être très petit pour que l'équation (11) représente des variations de h de l'ordre de grandeur de celles signalées par Gause.

L'équation logistique peut donc s'écrire maintenant :

$$(12) \quad \frac{dp}{dt} = \Sigma p(t) - h_0 p^2(t) - a p^3(t)$$

Cette équation donne pour p en fonction de t une représentation très compliquée. Or, dans l'équation (12), le terme en $ap^3(t)$ est très petit par rapport aux deux autres termes du second membre. En première approximation on peut donc admettre, pour l'équation (12), une solution analogue à celle de l'équation (3), soit :

$$p = \frac{\omega}{1 + \left(\frac{\omega}{p_0} - 1 \right) e^{-\lambda t}}$$

en remplaçant dans $\omega = \frac{\Sigma}{h}$ la valeur de h par la nouvelle valeur $h_0 + ap$.

Dans ces conditions :

$$\omega = \frac{\Sigma}{h_0 + a p} = \frac{\Sigma}{h_0 \left(1 + \frac{a}{h_0} p \right)}$$

ou sensiblement :

$$\omega = \frac{\Sigma}{h_0} \left(1 - \frac{a}{h_0} p \right) = \omega_0 \left(1 - \frac{a}{h_0} p \right)$$

Tant que p est très petit $\frac{ap}{h_o}$ est négligeable; par suite l'équation logistique avec la solution :

$$p = \frac{\omega_o}{1 + \left(\frac{\omega_o}{p_o} - 1 \right) e^{-\lambda t}}$$

reste valable; c'est ce qui se passe au début de la culture. Ensuite il convient de remplacer ω_o par :

$$\omega = \omega_o \left(1 - \frac{a}{h_o} p \right)$$

c'est-à-dire d'écrire :

$$p = \omega_o \left(1 - \frac{a}{h_o} p \right) \frac{1}{1 + \left(\frac{\omega_o}{p_o} - \frac{a p}{h_o p_o} - 1 \right) e^{-\lambda t}}$$

En réalité, dans l'expression entre crochets du dénominateur, le terme $\frac{ap}{h_o p_o}$ est très petit, même pour sa valeur limite $\frac{a}{h_o}$, par rapport aux deux autres. En négligeant ce terme, la solution de l'équation (12) devient :

$$p = \omega_o \left(1 - \frac{a p}{h_o} \right) \frac{1}{1 + \left(\frac{\omega_o}{p_o} - 1 \right) e^{-\lambda t}}$$

ou :

$$p = \frac{\omega_o}{1 + \left(\frac{\omega_o}{p_o} - 1 \right) e^{-\lambda t}} - \frac{\frac{a \omega_o}{h_o} p}{1 + \left(\frac{\omega_o}{p_o} - 1 \right) e^{-\lambda t}}$$

Dans le second terme (terme correctif) on peut remplacer p par l'expression $\omega_o e^{-\lambda t}$

$$p = \frac{\omega_o}{1 + \left(\frac{\omega_o}{p_o} - 1 \right) e^{-\lambda t}} - \frac{K e^{-\lambda t}}{1 + \left(\frac{\omega_o}{p_o} - 1 \right) e^{-\lambda t}}$$

ou :

$$p = \frac{\omega_0}{1 + \left(\frac{\omega_0}{p_0} - 1\right) e^{-\lambda t}} - K e^{-\lambda t} + K \left(\frac{\omega_0}{p_0} - 1\right) e^{-2\lambda t}$$

Le troisième terme devient très petit dès que $t > 3$. Par suite :

$$p = \frac{\omega_0}{1 + \left(\frac{\omega_0}{p_0} - 1\right) e^{-\lambda t}} - \frac{K}{e^{\lambda t}}$$

On peut calculer K en utilisant les résultats expérimentaux. On trouve alors :

$$(13) \quad p = \frac{13,9}{1 + 450 e^{-2,5 t}} - \frac{4.870}{e^{2,5 t}}$$

Telle est la relation donnant la masse des microbes secs en fonction du temps. Pendant les quinze premiers jours de la culture, c'est-à-dire tant que le voile microbien n'est pas étendu sur toute la surface, il ne faut pas tenir compte, dans l'équation (13), du terme correctif $\frac{4.870}{e^{2,5 t}}$ qui représente, à partir du 15^e jour, la diminution de la ration quotidienne.

On est conduit aux résultats suivants :

Temps en semaines	1	2	3	4	5	6
Valeurs expérimentales	0,37	3,49	8,57	13,37	13,67	13,89
Valeurs calculées	0,36	3,50	8,66	13,38	13,87	13,89
	<u>13,9</u>		<u>13,9</u>		<u>4.870</u>	
$p =$	$\frac{\quad}{1 + 450.e^{-2,5 t}}$		$p = \frac{\quad}{1 + 450.e^{-2,5 t}}$		$-\frac{\quad}{e^{2,5 t}}$	

L'accord est évidemment très satisfaisant (fig. 2). Il faut donc en conclure qu'à partir du moment où le voile est formé, se manifeste une diminution de la prolifération microbienne, celle-ci étant due à la diminution de la ration alimentaire quotidienne.

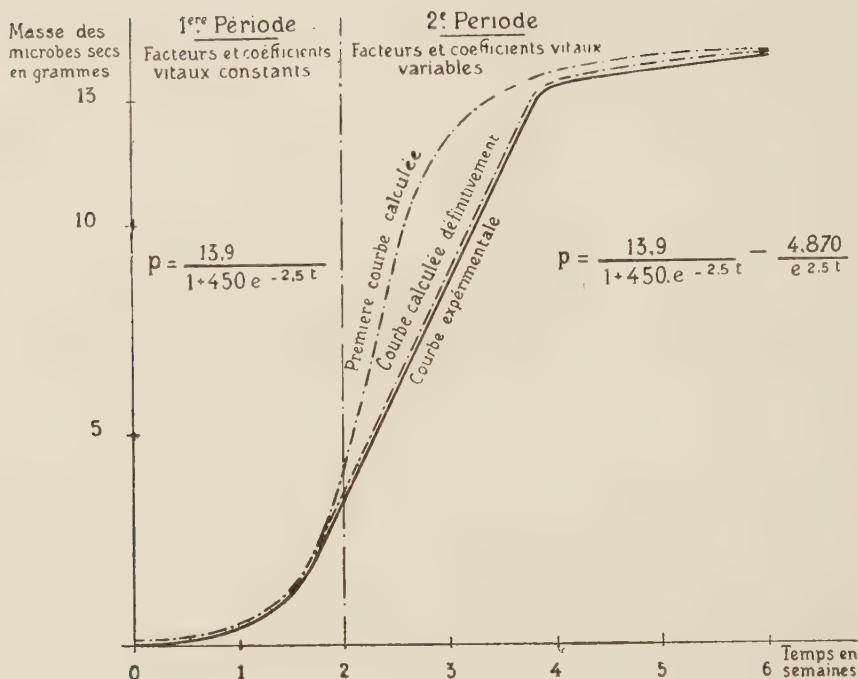


FIG. 2. — Courbes de l'évolution de la masse des microbes secs en fonction du temps.

En résumé : l'étude mathématique de la courbe de croissance, montre que le développement microbien se fait conformément à l'équation logistique.

— Les produits métaboliques ne sont pas toxiques de façon appréciable pour les microbes, aux concentrations qu'ils peuvent atteindre dans le milieu.

— Les microbes morts sont complètement lysés.

— Le développement s'interrompt, d'une part à cause du manque d'espace, d'autre part à cause de la diminution de la ration alimentaire.

Je suis parvenu effectivement à ensemercer des ballons neufs avec des parcelles de très vieux voiles (2 mois). Lorsqu'on lui fournit à la fois, l'espace nécessaire et une ration alimentaire abondante, la culture microbienne se développe rapidement dans les ballons neufs.

CHAPITRE III

SPECTRES D'ABSORPTION DE LIQUIDES DE SAUTON ENSEMENCÉS AVEC LE B. C. G.

Le liquide de Sauton présente une faible coloration jaune d'or qui indique une absorption notable des radiations violettes. Lorsque le B.C.G. s'est développé, le liquide est le siège d'un effet hyperchrome (la couleur jaune devenant plus foncé), qui se produit au bout d'une quinzaine de jours. Il correspond à la période pendant laquelle l'activité microbienne est la plus grande et disparaît ensuite progressivement. C'est cette évolution de la coloration qui m'a conduit à étudier le spectre d'absorption. L'absorption des liquides de Sauton, très faible dans le spectre visible, augmente rapidement vers les courtes longueurs d'onde, pour devenir quasi totale. Sur les diagrammes obtenus à l'aide du microphotomètre, la région spectrale dans laquelle l'absorption croît progressivement, que je désigne par seuil d'absorption, se traduit par une droite plus ou moins inclinée sur l'axe des abscisses (longueurs d'ondes) et comprise entre deux segments courbes de faible longueur. Les limites du seuil d'absorption sont obtenues, assez arbitrairement d'ailleurs, en négligeant les segments précédents et en prolongeant simplement la partie rectiligne.

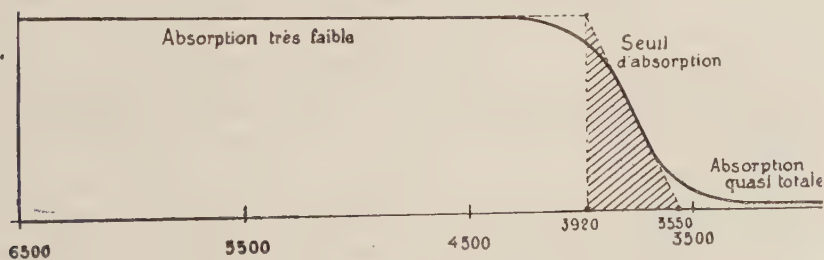


FIG. 3. — Enregistrement au microphotomètre d'un seuil d'absorption.

Le liquide de Sauton non ensemencé présente un seuil d'absorption bien défini s'étendant de 3.920 à 3.550 A au delà duquel l'absorption est totale (fig. 3). Dans le spectre visible, le microphotomètre permet de déceler une très légère bande comprise entre 4.860 et 4.600 A.

Pour le liquide de Sauton où s'est développé le B.C.G., le spectre d'absorption évolue en fonction du temps comme l'indique le tableau suivant :

TABLEAU I

Durée de la culture	Bande : 5300-5170 A	Bande : 4860-4600 A	Seuil précédant l'absorption totale
Sauton stérile		très faible	3920-3550 A
Culture de 7 j.	très faible	faible	4020-3650
— — 14 j.		assez forte	4080-3710
— — 21 j.		forte	4220-3850
— — 28 j.		faible	4020-3650
— — 35 j.		très faible	3990-3620
— — 42 j.			3950-3580
— — 49 j.			3920-3550

Ainsi, après une évolution très nette du spectre d'absorption, celui-ci reprend, pour les très vieilles cultures, les mêmes caractères que pour les bouillons témoins (8).

Il faut noter que, dans les cultures de 49 jours ou plus, le voile microbien est souvent tombé au fond du ballon.

La modification du spectre d'absorption est la plus rapide dans la période qui correspond à l'activité microbienne la plus grande. Il existe alors environ dix grammes de microbes secs par litre de Sauton (fig. 4).

Afin d'éprouver la généralité de la méthode, j'ai recherché si chaque microbe influençait réellement d'une manière caractéristique le spectre d'absorption du milieu où il se développe.

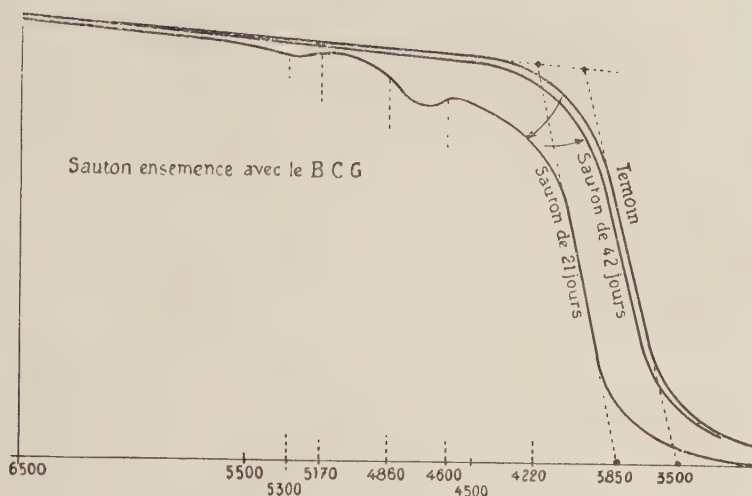


FIG. 4. — Enregistrement au microphotomètre des spectres d'absorption du milieu de Sauton enseimencé avec le B. C. G.

GÉNÉRALISATION DE LA MÉTHODE DES SPECTRES D'ABSORPTION

Les différents bacilles tuberculeux : humains, aviaires, bovins, cultivés dans le liquide de Sauton, donnent entre le 10^e et le 25^e jour de la culture, des spectres d'absorption analogues. Ces spectres présentent cependant des particularités qui permettent de les différencier très aisément. La distinction, dans les vieilles cultures, n'est, au contraire, plus possible.

Dans le même ordre d'idées, j'ai entrepris en collaboration avec le D^r Burnet, une étude systématique des espèces du genre *Brucella* dûment classées et reconnues régulières par le centre de recherches sur la fièvre ondulante de Montpellier (10).

Les souches : *Br. melitensis* (H), *Br. abortus* (B), *Br. suis* (S) donnent les résultats suivants :

Les cultures de la souche H sont beaucoup plus absorbantes que celles de B et de S et que le bouillon témoin non enseimencé. Les cultures B et S diffèrent moins entre elles qu'elles ne diffèrent de H. Dans les premiers jours, la culture de B est plus absorbante que celle de S; plus tard la culture de S devient plus absorbante que celle de B.

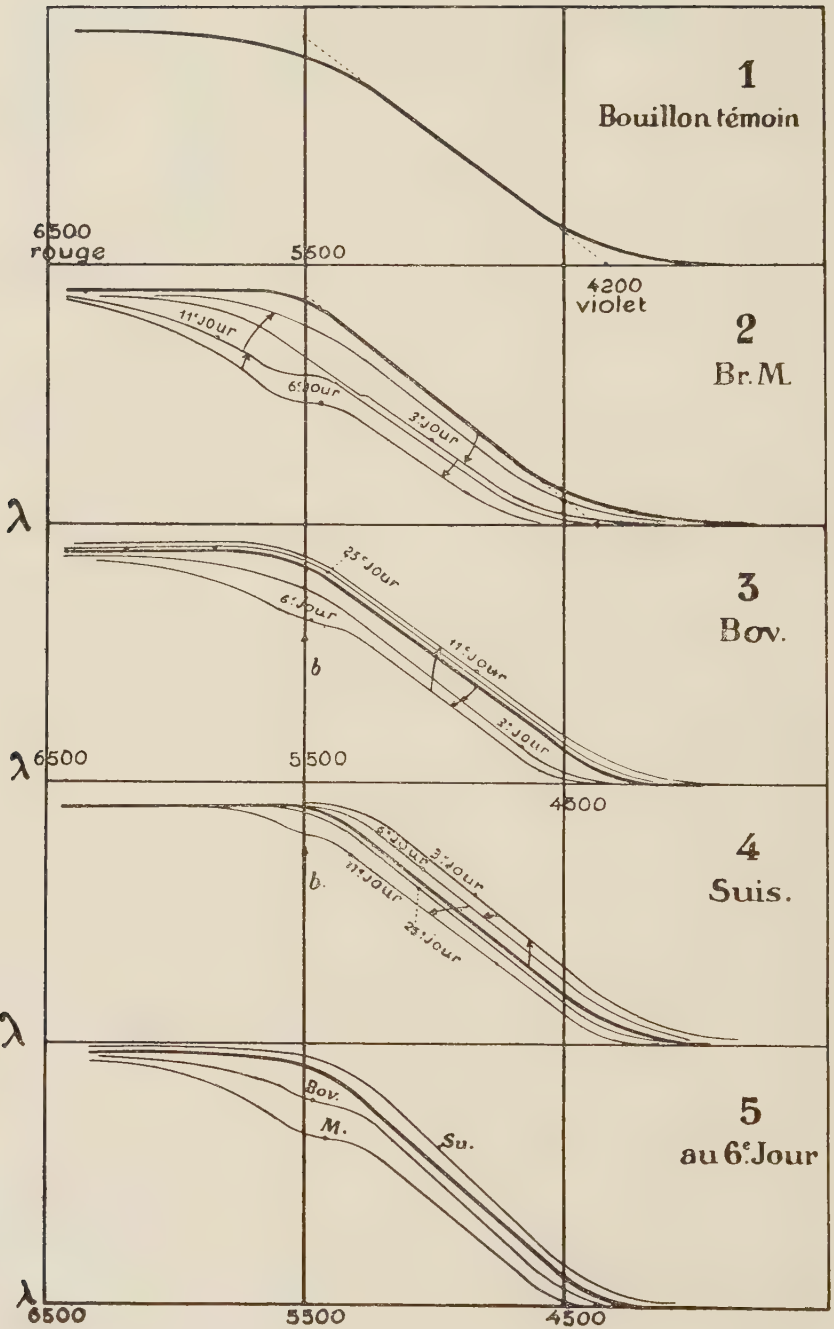


FIG. 5. — Evolution du spectre d'absorption de bouillons ensemencés avec les différentes espèces du genre *Brucella*.

Sur les diagrammes d'enregistrement (fig. 5) les courbes correspondant à *H* se trouvent toujours du côté des grandes longueurs d'onde par rapport à la courbe du bouillon témoin. Au contraire les courbes successives de *B* et de *S* oscillent de part et d'autre de la courbe du témoin.

Après 30 jours de culture à 37° C. les divers bouillons donnent sensiblement le même spectre, lequel est sensiblement celui du bouillon témoin.

Appliquant les résultats précédents j'ai pu, avec le D^r Burnet, diagnostiquer de façon correcte des souches reconnues irrégulières ou aberrantes par rapport aux caractères Huddleson (souches fournies par M. le Professeur Lisbonne).

De même le spectre d'un bouillon ensemencé avec le bacille d'Eberth diffère nettement, pendant un certain temps, de ceux des cultures de para A et de para B.

Enfin j'ai fait une étude assez complète du bouillon Martin (bouillon de viande, dont la composition chimique n'est pas exactement déterminée), si souvent utilisé en bactériologie parce qu'il est pratiquement constant (10). Le bouillon Martin présente initialement, dans le spectre visible, une absorption générale faible, qui croît assez brusquement vers 4.800 Å et devient totale au voisinage de 4.400 Å. Ce seuil d'absorption peut d'ailleurs se déplacer de 100 à 200 Å. dans un sens ou dans l'autre suivant la méthode de préparation utilisée.

Le bouillon Martin a été ensemencé avec les anaérobies suivants :

Bacillus œdematiens, *Bacillus perfringens*, *Vibrio septicus*, *Bacillus tetani*.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus :

TABLEAU II

Temps	Seuils d'absorption			
	<i>Tetani</i>	<i>Perfringens</i>	<i>Septicus</i>	<i>Œdematiens</i>
3 jours	4500-4100	4600-4100	4400-3900	4600-4100
4 jours	4550-4150	4400-3900	4500-4000	4500-4100
10 jours	4800-4300	4600-4200	4600-4200	4500-4100
25 jours	4800-4300	4700-4300	4800-4400	4550-4000

Bouillon Martin non ensemencé. Seuil de 4.800 à 4.400 A. Vers le 5^e jour de la culture il apparaît de plus des bandes d'absorption dans le bouillon Martin ensemencé avec *B. tetani*, bandes qui disparaissent par la suite.

Au total, la méthode des spectres d'absorption semble présenter un intérêt général pour l'étude des espèces et variétés microbiennes, que l'on cultive les microbes dans un liquide chimiquement défini comme celui de Sauton ou dans un bouillon de viande peptoné, bouillon Martin ou autre.

Il faut remarquer que la méthode n'est utilisable pour différencier les microbes, qu'au moment où leur activité est la plus intense.

II^e Partie

Évolution chimique du liquide de Sautonensemencé avec le bacille tuberculeux B.C.G.

CHAPITRE IV

ÉCHANGES GAZEUX

1^o DIMINUTION, DURANT LEUR SÉJOUR A L'ÉTUVE A 37° C.,
DE LA MASSE TOTALE DES BALLONS ENSEMENCÉS :

Les ballons, sortant de l'autoclave, sont pesés, qu'ils soient ensemencés ou qu'ils soient conservés stériles comme témoins. Ils sont alors tous placés dans l'étuve, sur la même tablette. La température centigrade est de 37°. Tous les ballons sont sensiblement à la même distance du générateur de chaleur (rhéostat). Des essais en cours semblent, en effet, montrer que le démarrage des cultures serait en relation avec un certain domaine d'infra-rouge, rayonné par la source thermique.

Les ballons, étant ainsi tous dans les mêmes conditions thermiques et hygrométriques, sont pesés toutes les semaines.

Rapportés au litre de Sauton, les pertes de masse des ballons par échanges gazeux, pour une même surface d'évaporation (300 cm²) sont en grammes, en moyenne, les suivantes :

Temps en jours	5	7	14	21	28	35	42
Ballon témoin		0	7	14	25	33	40
Culture en voile de B.C.G.		3	10	30	37	37	37

La fig. 6 représente cette perte de masse pour les ballons stériles et les ballons ensemencés.

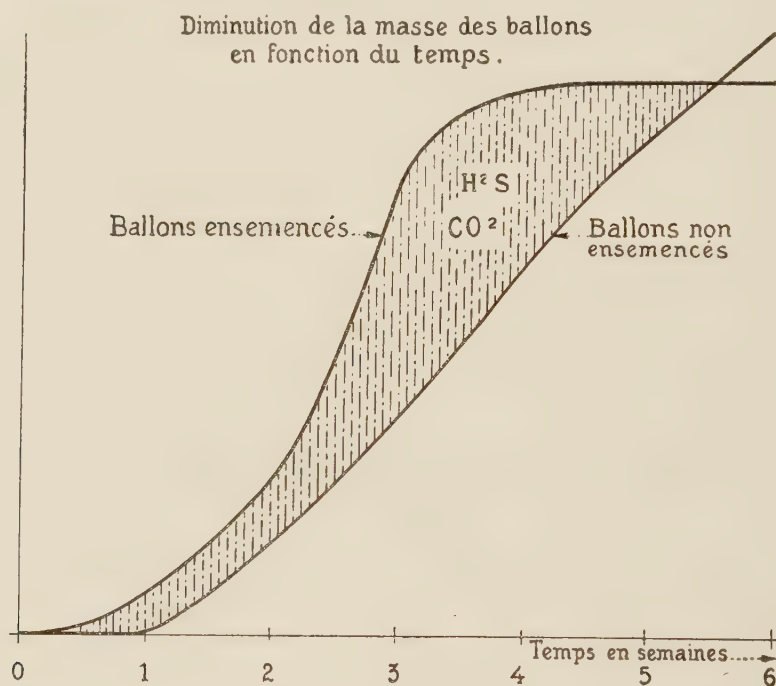


FIG. 6. — Diminution de la masse des ballons contenant le Sauton pendant leur séjour à l'étuve.

BALLONS TÉMOINS :

Ils perdent linéairement 7 g. par semaine, sauf du 21^e au 28^e jour, où ils subissent une perte supplémentaire. Celle-ci correspond, comme je le montrerai par la suite, à une perte d'azote des ballons témoins, perte qui se fait sous forme ammoniacale.

BALLONS ENSEMENCÉS :

Ils perdent d'abord 7 g. du 7^e au 14^e jour. A ce moment le voile microbien s'étale progressivement sur toute la surface libre. La perte atteint 20 g. du 14^e au 21^e jour, tandis que la masse de microbes secs passe de 3,5 g. à 8 g.

Durant la semaine suivante, la perte redevient de 7 g. Le voile se plisse. La masse microbienne n'augmente presque plus à partir du 28^e jour. Il n'y a alors plus de pertes, les ballons conservent sensiblement une masse constante, comme si le voile très épais interdisait tout échange gazeux entre le liquide de Sauton et l'atmosphère.

2° ÉTUDE QUALITATIVE DES ÉCHANGES GAZEUX :

VAPEUR D'EAU :

Les ballons conservés à l'étuve 37° C. doivent évidemment perdre de la vapeur d'eau. Ayant analysé d'anciens témoins, conservés 6 semaines à l'étuve, leur concentration en glycérol et en ions SO^4 est plus forte que dans les Sautons récemment préparés.

Par exemple, alors qu'un témoin récent donne, au dosage, 59,6 g. de glycérol pour un litre, un témoin de même fabrication, après un séjour de 6 semaines à l'étuve, donne après titrage 62,1 g. de glycérol. Ce résultat correspond, tous calculs faits, à une masse d'eau de 900,5 g. dans le Sauton stérile étuvé 6 semaines, contre 941,3 g. dans le Sauton stérile récent. Ainsi un ballon-témoin perdrait 40,8 g. d'eau pendant un séjour de 6 semaines à l'étuve.

Ayant de même étudié la concentration en ions SO^4 , j'ai pu retrouver, dans les mêmes conditions, une perte d'eau de 38 g.

Ces pertes de l'ordre de 40 g. correspondent à celles observées par pesées. Les ballons ensemencés doivent, eux aussi, perdre de la vapeur d'eau tant que le voile n'isole pas le liquide de l'atmosphère.

HYDROGÈNE SULFURÉ :

Ayant placé des papiers à l'acétate de plomb au-dessus de tous les témoins et de tous les ballons ensemencés, les papiers sont restés immuablement blancs au-dessus des témoins. Ils noircissent au contraire progressivement au-dessus des cultures de

B.C.G. du 7^e au 28^e jour, c'est-à-dire pendant la période où les ballonsensemencés perdent plus de produits volatils que les témoins et où le développement microbien est le plus intense. Les cultures de B.C.G. dégagent donc de l'hydrogène sulfuré. Il doit s'en dégager fort peu. Le Sauton ne contient que 0,04 g. de soufre; après culture, il en reste encore 0,022 g. dans le liquide. En négligeant le soufre que peuvent contenir les microbes, il n'a pu s'en dégager au maximum que 0,018 g., ce qui correspond à peu près à 12,5 cm³ de H²S dans les conditions normales. Ce sont ces 12,5 cm³ qui noircissent le papier à l'acétate de plomb.

ANHYDRIDE CARBONIQUE :

Des prélèvements d'air, au-dessus des témoins, ne troublent nullement l'eau de chaux.

Des prélèvements au-dessus des ballonsensemencés donnent au contraire des précipités blancs abondants.

AMMONIAC OU AMINE :

J'ai obtenu des fumées blanches avec un agitateur trempé dans l'acide chlorhydrique, au-dessus des témoins de 3 semaines et plus.

Je n'ai rien observé de tel au-dessus des voiles de B.C.G.

En résumé, tandis que les témoins perdent de la vapeur d'eau et, vers la 3^e semaine, un peu d'ammoniac ou d'amine, les ballonsensemencés perdent de la vapeur d'eau, de l'hydrogène sulfuré et l'anhydride carbonique.

3^e ÉTUDES QUANTITATIVES :

Après quelques tâtonnements, le dispositif ci-après (fig. 7) m'a permis d'étudier convenablement les échanges gazeux. Un ballon de 1.053 cm³ est mis en circuit avec une bonbonne contenant 21.752 cm³ d'air. La tubulure 1 est réunie à une poire de caoutchouc P, faisant l'office de pompe aspirante et foulante. Le tube 2 permet la circulation gazeuse quand la pompe fonctionne. Le volume d'air des tubes 1 et 2 et de la pompe est de 263 cm³. Le tube 3 sert à faire les prélèvements gazeux. Le manomètre à eau 4

permet de juger des variations de pression. Les tampons de coton 5 et 6 filtrent l'air.

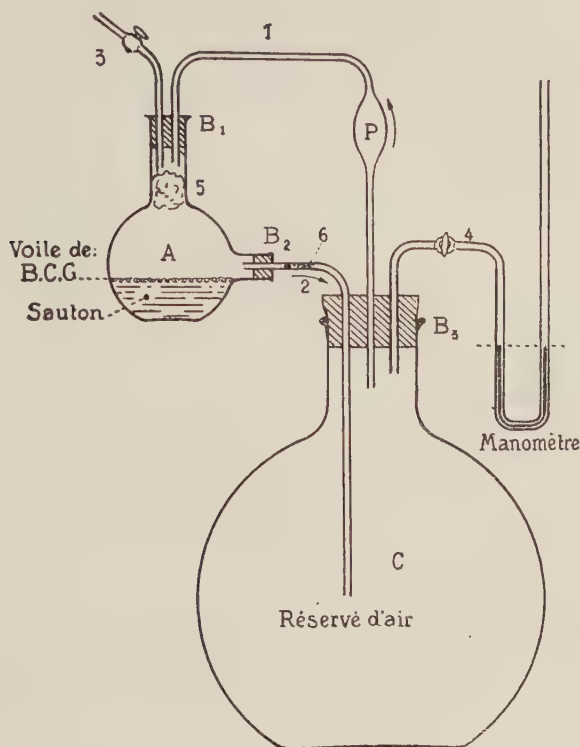


FIG. 7. — Appareil pour l'étude des échanges gazeux.

Les ballons A et C étant vides, les bouchons de caoutchouc B_1 , B_2 , B_3 , ayant été munis de picéine, le dispositif tient parfaitement un vide de 1 mm. de Hg pendant 4 semaines.

Le ballon A contenant 300 cm³ de Sauton est stérilisé à l'autoclave, puis ensemencé en voile avec du B.C.G. et adapté sur le ballon C. La réserve d'air est alors de 22.768 cm³, les microbes disposent donc de 4.781 cm³ d'oxygène.

Cette quantité d'oxygène assure convenablement le développement microbien durant une dizaine de jours, en moyenne, au début de la culture, pendant 5 jours ensuite quand la vie microbienne est intense.

Ayant analysé l'atmosphère obtenue, il suffit de la renouveler; le manomètre 4 étant débranché, un balayage d'air par les orifices 3 et 4 réalise l'opération en 30 minutes environ.

Une analyse de l'air dans les ballons A et C permet de contrôler la fin de l'opération. Tout est refermé et le développement microbien peut reprendre en circuit fermé pendant 5 jours.

Remarque : La pression dans le dispositif reste sensiblement égale à la pression atmosphérique (à quelques millimètres d'eau près).

PREMIERS RÉSULTATS :

L'appareillage étant en place, j'ai fait des prélèvements d'air réguliers avec un aspirateur à 2 flacons à deux tubulures, l'une allant au fond du flacon, l'autre s'arrêtant au-dessous du bouchon. Les tubulures plongeantes des deux flacons sont réunies par un tube de caoutchouc. Un flacon est rempli d'eau. Le passage de l'eau dans le 2^e flacon par siphonage permet, en aspirant, d'effectuer les prélèvements gazeux.

L'air a été analysé dans un appareil de Hahn d'abord, puis dans un appareil de Vignon (11). Dans ce dernier, les absorptions sont plus lentes, mais la manipulation des robinets s'est montrée beaucoup plus pratique (fig. 8).

Ayant fait des essais de combustion en présence d'oxygène, je n'ai pas trouvé qu'il se soit formé de produits combustibles. H^2S est dégagé en trop petite quantité pour être décelable quantitativement. Finalement, j'ai simplement dosé l'oxygène et l'anhydride carbonique. J'ai obtenu N par différence.

CO^2 était absorbé par une solution formée d'une partie de $K(OH)$ pour 2 parties d'eau, solution qui pouvait absorber 40 fois son volume de CO^2 .

O était absorbé par une solution de 15 g. de pyrogallol dans 50 cm³ d'eau, additionnés de 250 cm³ d'une lessive de $K(OH)$ contenant 1 partie de potasse pour 2 parties d'eau. Une telle solution absorbe 2 fois son volume d'oxygène.

J'opérais sur 100 cm³, à 20° C., afin d'avoir des absorptions rapides et des résultats comparables.

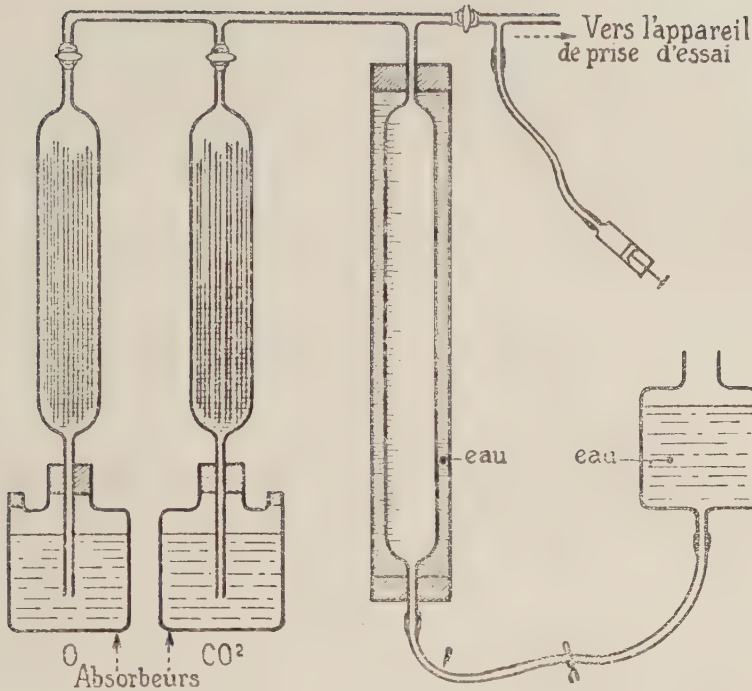


FIG. 8. — Appareil réduit de Vignon pour l'analyse des gaz.

Analyse de l'air initial lors de l'ensemencement :

100 cm ³	{	CO ²	0	t = 18° C. P = 760 mm. Hg
		O	21 cm ³	
		N	79 cm ³	

Après 10 jours de culture microbienne :

100 cm ³	{	CO ²	3,5 cm ³	t = 18° C. P = 760 mm. Hg
		O	15 cm ³	
		N	81,5 cm ³	

Il y a ainsi enrichissement apparent en N.

Dans toutes les analyses, le volume de gaz carbonique obtenu est inférieur au volume d'oxygène disparu. Il y a donc fixation d'oxygène dans les ballons.

Ceci explique l'enrichissement apparent en N. Les pourcentages de N étant obtenus par différence, sont d'ailleurs peu précis.

Remarque 1 : En 10 jours, il s'est développé 1,5 g. de microbes frais, alors qu'il a disparu 1,400 l. d'oxygène. Ceci correspond sensiblement à 0,9 cm³ d'O consommé par milligramme de microbes frais en 240 heures.

Résultat 240 fois plus petit que celui de Loebel, Shorr et Richardson qui trouvaient 1 cm³ par milligramme et par heure (12).

Remarque 2 : Si l'atmosphère n'est pas renouvelée, la culture se conserve sensiblement dans le même état en présence de 9 % d'O et de 9 % de CO². La masse microbienne reste constante.

Remarque 3 : Ayant fait l'analyse de l'air, au-dessus des ballons ensemencés depuis 5 semaines avec le B.C.G. et en communication libre avec l'atmosphère, j'ai trouvé sensiblement la composition suivante pour tous les ballons :

CO ²	3,75 cm ³	
O	15 cm ³	t = 18° C.
N	81,25 cm ³	P = 760 mm. Hg

RÉSULTATS GÉNÉRAUX :

Ayant renouvelé périodiquement l'atmosphère dans le circuit fermé et ayant continué les analyses, j'ai trouvé finalement, en rapportant les résultats au litre de Sauton, ce qui suit :

En 4 semaines de culture la consommation d'oxygène est de 15 grammes.

La masse de CO² est de 10 g., mais la masse de microbes secs obtenus ne correspondait qu'à 10,530 g. par litre en moyenne.

EN RÉSUMÉ :

Les Sautons stériles perdent un peu d'azote et de la vapeur d'eau.

Les Sautons ensemencés perdent un peu de H²S, de la vapeur d'eau et environ 10 g. de CO² en 4 semaines.

Ils assimilent, d'autre part, 15 g. d'oxygène pour une formation de 10 g. de microbes secs (60 g. de microbes frais).

Sur ces 15 grammes, 7,3 repartent sous forme de CO². Finalement les microbes et le liquide conservent 7,7 g. d'oxygène. Une

partie de celui-ci pourra oxyder le milieu et le rendre acide, c'est ce que l'on peut étudier par la mesure du pH.

Remarque : Je n'ai pas analysé les microbes obtenus en atmosphère fermée. Il est possible qu'ils aient une composition différente de ceux obtenus à l'air libre.

CHAPITRE V

ÉVOLUTION DU pH

J'ai mesuré le pH avec l'appareil colorimétrique de Hellige et Cie (Freiburg).

Un ballon témoin conservé à l'étuve 37° C. voit son pH décroître très légèrement en fonction du temps à partir de la 3^e semaine. Un ballon ensemencé avec le B.C.G. devient d'abord basique, puis le pH se met à décroître quand le développement microbien devient important.

Temps	0	7	14	21	28	35	42
Témoin	7,1	7,1	7,1	7,1	7	7	6,9
Culture de B.C.G.	7,2	7,4	7,5	7,4	7	6,4	6

L'évolution du pH du témoin traduit, comme je le montrerai par la suite, une hydrolyse de l'asparagine.

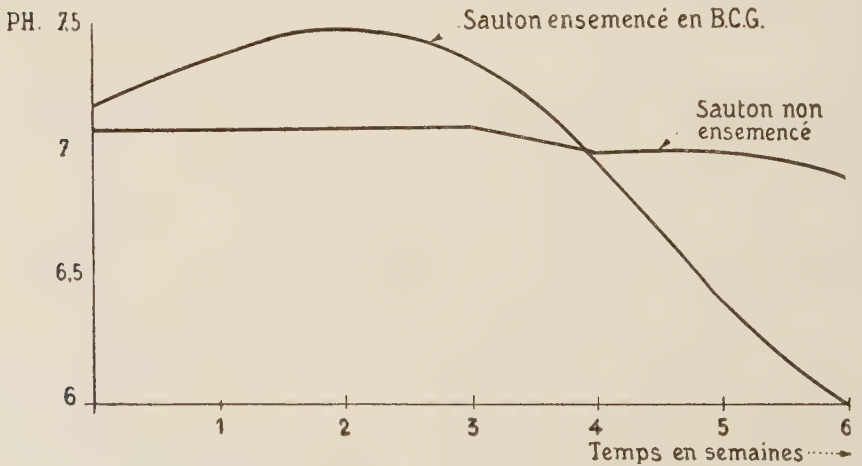


FIG. 9. — Evolution du pH du Sauton en fonction du temps.

Quant au ballonensemencé, son p_H basique correspond à la période de grande activité microbienne, période pendant laquelle le spectre d'absorption du liquide présente les plus grandes modifications (fig. 9).

CHAPITRE VI
ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION
DES IONS SO^4 ET PO^4

a) ION SO^4 :

Le liquide de Sauton contient 0,5 g. de sel $\text{SO}^4 \text{Mg} \cdot 7\text{H}^2\text{O}$, au départ. J'ai dosé le sulfate sur les cendres. 50 cm^3 de Sauton sont évaporés à sec, puis calcinés, puis repris par l'acide chlorhydrique. Ce traitement détruit totalement les produits organiques.

En présence de Cl^2Ba , la liqueur chlorhydrique obtenue donne un précipité blanc de sulfate de baryum. Ce précipité centrifugé et séché 6 heures à l'étuve à 105°C . pèse : 0,340 g. par litre de Sauton.

Une solution de 0,5 g. de sulfate de magnésium dans 1 litre d'eau distillée, soumise au même traitement, m'a donné un précipité de : 0,341 g.; enfin le calcul conduit à envisager la formation d'un précipité de 0,344 g.

$$\text{Erreur relative : } \frac{4}{344} \# \frac{1}{80}$$

La méthode précédente permet donc de trouver de façon correcte la masse de l'ion SO^4 que contient le Sauton.

Les résultats sont les suivants :

Temps	0	7	14	21	28	35	42
Massede SO^4	0,340	0,306	0,170	0,153	0,102	0,176	0,187

Tandis que la croissance de la masse microbienne est continue, le milieu s'appauvrit d'abord en ions SO^4 . Cet appauvrissement est maximum au bout du 28^e jour (fin de la prolifération rapide), puis le milieu s'enrichit de nouveau en ions SO^4 .

b) ION PO^4 :

Le Sauton neuf contient 0,5 g. de phosphate bipotassique.

J'ai d'abord fait une recherche directe de l'acide phosphorique sur le Sauton pur par la méthode au phosphate d'uranium (13). Une solution de nitrate d'uranium et une solution acétique de phosphate sont maintenues en présence à une température voisine de l'ébullition. Il se forme un précipité de phosphate d'uranium. On opère en présence de teinture de cochenille. Le moindre excès de la liqueur d'urane produit avec la cochenille une laque verte.

Opérant avec des solutions titrées, j'ai trouvé, tous calculs faits, 0,920 g. de $\text{PO}^4\text{K}^2\text{H}$ dans les Sautons stériles récents qui ne contiennent effectivement que 0,500 g. de phosphate bipotassique. La méthode ne s'applique donc pas, à ce milieu complexe qu'est le Sauton.

Elle donne au contraire 0,495 g. de phosphate pour une solution de 0,500 g. de $\text{PO}^4\text{K}^2\text{H}$ dans 1 litre d'eau distillée.

J'ai par suite repris, là encore, la destruction préalable des produits organiques du Sauton.

50 cm^3 de Sauton sont évaporés à sec, puis calcinés, puis repris par HCl.

Titrage de la solution de nitrate d'uranium :

50 cm^3 d'une solution de 0,5 g. de $\text{PO}^4\text{K}^2\text{H}$

5 cm^3 d'une solution saturée d'acétate de soude acétique

1 cm^3 de teinture de cochenille

sont portés à l'ébullition.

On verse à l'aide d'une burette de Mohr la solution inconnue de nitrate d'uranium jusqu'à ce que l'addition d'une goutte fasse virer au vert le mélange primitivement rouge.

Il est facile alors de calculer le titre de la solution de nitrate d'uranium : 1 cm^3 de cette liqueur correspond à 0,00643 g. de PO^4 .

Titrage de l'ion PO^4 :

50 cm^3 de la solution à titrer

1 cm^3 de teinture de cochenille

sont additionnés de quelques gouttes d'ammoniaque jusqu'à virage au violet.

Quelques gouttes d'acide nitrique dilué rendent la liqueur rouge. Il suffit d'ajouter 5 cm³ d'une solution d'acétate de soude acétique et de porter à l'ébullition.

On verse la liqueur titrée d'urane jusqu'à teinte verte (sans s'arrêter aux teintes gris sale). Il suffit alors de faire le calcul.

J'ai contrôlé mes analyses par le procédé de la touche au ferrocyanure de potassium. On met en présence : 1 goutte du mélange précédent chauffé (comprenant : la solution de phosphate à doser, de l'acétate de sodium et du nitrate d'uranium) et 1 goutte de ferrocyanure de potassium.

Dès que l'urane est en excès, le mélange des 2 gouttes prend une teinte chamois, due à la formation de ferrocyanure d'uranium.

Ce procédé permet de contrôler nettement le moment où tout le phosphate s'est transformé en phosphate d'uranium et où il faut lire la quantité de nitrate d'urane utilisé.

En appliquant les méthodes précédentes à du Sauton stérile récent, j'ai pu retrouver 0,490 g. de phosphate, alors qu'il en contient réellement 0,500 g. par litre (erreur : 2 %). J'ai donc adopté ces méthodes.

Évolution du phosphate ou plutôt de la concentration de l'ion PO^4 en fonction du temps.

Jours	0	7	14	21	28	35	42
Massede PO^4	0,272	0,231	0,204	0,163	0,143	0,108	0,123

Là encore la concentration en ions PO^4 passe par un minimum alors que la masse des microbes croît constamment.

EN RÉSUMÉ :

Pour les ions SO^4 et PO^4 il y a passage par un minimum de leurs concentrations. Ceci s'explique en remarquant que les corps microbiens de B.C.G. dans les cultures de 40 jours ne renferment plus que la moitié de la matière minérale qu'ils contenaient dans les cultures de 15 jours (14).

Au bout de 40 jours, les vieux microbes en se déminéralisant réenrichissent le milieu en ions PO^4 et SO^4 , d'autant qu'il ne se forme plus que très peu de jeunes microbes.

CHAPITRE VII

CONSOMMATION DE L'ACIDE CITRIQUE ET DU GLYCÉROL

1° ACIDE CITRIQUE : $C^6H^8O^7$.

Le Sauton en renferme 2 grammes.

Je l'ai dosé par la méthode de Denigès (15).

Celle-ci, excellente pour des solutions d'acide citrique dans l'eau, m'a donné aussi de bons résultats pour l'acide citrique des Sautons neufs. Le produits d'oxydation de l'acide citrique par le permanganate de potassium en milieu acide donne une combinaison insoluble avec le sulfate mercurique.

J'ai utilisé la technique suivante :

A 10 cm^3 d'une solution titrée d'acide citrique à 1 p. 1.000, on ajoute 1 g. de bioxyde de plomb. Après avoir agité fortement, on introduit 1 cm^3 d'une solution acide de sulfate mercurique préparée en dissolvant : 5 g. d'oxyde de mercure HgO dans 20 cm^3 d'acide sulfurique concentré et 100 cm^3 d'eau. On agite 1 minute. On filtre. Le filtrat doit être limpide.

A 5 cm^3 du liquide précédent, on ajoute $0,5\text{ cm}^3$ d'une solution de permanganate de potassium à 2 p. 100 et on porte à l'ébullition jusqu'à décoloration complète.

On obtient un trouble très net pour cette concentration de 1 p. 1.000 d'acide citrique.

Au contraire, pour une concentration de 0,1 p. 1.000, on a un louche à peine visible et pour une concentration de 4 p. 1.000, un précipité floconneux blanc abondant.

J'ai alors établi une gamme de précipités pour les concentrations suivantes :

p. 1.000 d'acide citrique dans l'eau distillée :

0,1	0,5	1	1,15	1,25	1,35	1,5
1,65	1,75	1,85	2	2,25	2,5	

Faisant l'hypothèse que la réaction valable pour le Sauton stérile l'est aussi pour le Sautonensemencé avec le B.C.G., j'ai pu ainsi doser l'acide citrique des bouillons par comparaison avec les étalons précédents.

Remarque : L'addition de 1 g. d'acide citrique dans un litre de Sautonensemencé avec le B.C.G. et ne contenant plus selon la méthode précédente que 1,2 g. d'acide citrique, m'a donné après dosage 2,25 g. d'acide citrique. La méthode semble donc acceptable.

Résultats :

Temps en jours ..	0	7	14	21	28	35	42
Acide citrique restant	2	1,75	1,6	1,5	1,25	1,2	1,2

Ainsi les 2/5 de l'acide citrique ont été consommés lors du développement microbien.

2° GLYCÉROL :

Le Sauton en renferme 60 g. Ce glycérol est partiellement hydraté. D'après sa densité il renferme environ 6 p. 100 d'eau. J'ai dosé le glycérol par deux méthodes : celle de Laborde et celle de Nicloux.

A) MÉTHODE DE LABORDE : (17)

50 cm³ de Sauton sont introduits dans un matras avec 100 g. de grains de plomb et un peu de limaille de zinc. On distille. Quand il n'y a plus que 2 à 3 cm³ de liquide on laisse refroidir. On ajoute 2 g. de chaux éteinte. On agite de façon à avoir une masse très divisée enrobant les grains de plomb. On verse alors dans le matras 75 cm³ d'un mélange de 2 volumes d'éther pour un d'alcool. On agite. On décante sur un filtre sans plis. On a une

solution de glycérol à peu près pure. On évapore sous le vide. Le liquide restant est placé dans un exsiccateur. Sa masse diminue progressivement en fonction du temps. La dessiccation du glycérol est très difficile et n'est complète que sous le vide, en présence d'acide sulfurique, après un laps de temps de 1 ou 2 semaines.

Comme j'étudiais la disparition relative du glycérol dans mes cultures chaque semaine, j'ai obtenu chaque fois la masse du glycérol en interpolant les résultats de 3 pesées successives faites à 16 heures d'intervalle.

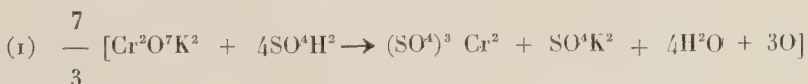
Les résultats sont alors les suivants :

Temps en jours ..	0	7	14	21	28	35	42
Masses de glycérol pur en gr. par litre	55	55	50	42	36	30	23

Cette méthode s'est révélée longue et délicate. Je devais faire les dosages de toutes les substances contenues dans le Sauton en une semaine, afin de pouvoir étudier mon milieu de culture de 7 jours en 7 jours. Au total après avoir reconnu que la méthode de Nicloux, beaucoup plus rapide, me donnait sensiblement les mêmes résultats que la méthode de Laborde, j'ai surtout utilisé la méthode chromométrique.

B) MÉTHODE DE NICLOUX ou MÉTHODE CHROMOMETRIQUE (16) :

On oxyde le glycérol en milieu sulfurique par l'acide chromique :



Selon ces équations, 1 g. de glycérol pur est oxydé par 7,456 g. de bichromate de potassium. Par suite, 1 g. de glycérol à 6 p. 100 d'eau est oxydé par 7,008 g. de bichromate. J'ai trouvé expérimentalement qu'à 1 g. de glycérol correspondent 6,879 g. de bichromate (soit une erreur de 1,7 p. 100).

La technique employée est la suivante :

Dans 3 tubes à essais on introduit 5 cm³ de la solution de glycérol à doser et 5 cm³ d'acide sulfurique pur. On agite. On chauffe à l'ébullition. On ajoute par dixième de cm³ la liqueur titrée de bichromate de potassium (à 19 g. par litre). Le mélange est d'abord franchement vert, couleur due au sulfate de chrome. Puis le glycérol étant peu à peu oxydé, la teinte va en se dégradant vers le jaune quand on ajoute du bichromate. On note alors le nombre de centimètres cubes utilisés de la liqueur de bichromate.

Les deuxième et troisième tubes servent à encadrer le résultat final. Un tube est rendu nettement jaune, l'autre nettement vert. On garde le résultat correspondant au tube intermédiaire. Ayant dosé différentes concentrations de glycérol dans l'eau distillée, j'ai retrouvé expérimentalement des concentrations théoriques du glycérol à 2 p. 100 près.

La méthode ne donne de bons résultats que si la solution contient au maximum 2 g. de glycérol par litre. Pour faire l'étude du Sauton qui contient au départ 60 g. de glycérol par litre j'ai dilué 40 fois. Le liquide obtenu contient ainsi 1 g. 5 de glycérol par litre.

Mais il faut remarquer que le mélange sulfo-chromique oxyde aussi, dans le Sauton, l'acide citrique qui comporte également une fonction alcool.

Il y a 2 g. d'acide citrique pour 60 g. de glycérol dans 1 litre de Sauton. Pour oxyder 5 cm³ d'une solution aqueuse à 0,05 p. 1.000 d'acide citrique, il faut 0,03 cm³ de la solution titrée de bichromate. Pour oxyder 5 cm³ d'une solution aqueuse à 1,5 p. 1.000 de glycérol il faut 2,62 cm³ de la solution de bichromate. Enfin pour oxyder 5 cm³ d'une solution aqueuse à 1,5 p. 1.000 de glycérol et 0,05 p. 1.000 d'acide citrique il faut 2,65 cm³ de la solution de bichromate.

On retrouve le même résultat avec 5 cm³ d'une solution de Sauton stérile diluée 40 fois.

Ainsi la solution de bichromate oxyde uniquement, dans le Sauton stérile, le glycérol et l'acide citrique.

J'aurais pu d'ailleurs obtenir un dosage plus précis en utilisant un excès du mélange sulfo-chromique. Un dosage ultérieur au sulfate ferreux m'aurait donné ensuite l'excès d'oxydant.

Je n'ai pas utilisé cette méthode car je désirais employer une méthode rapide et pratique me donnant le glycérol.

J'ai donc dosé chaque semaine des cultures de B.C.G. en Sauton par le mélange sulfo-chromique.

La présence de l'acide citrique produit, sur le dosage du Sauton stérile, une correction de $\frac{3}{265} \# \frac{1}{80}$

J'ai admis que cette correction était négligeable et que le résultat obtenu représentait le glycérol.

D'autre part, au cours de la culture, le glycérol donne des dérivés qu'oxyde le mélange sulfo-chromique. On peut admettre en première analyse que ces dérivés se forment en quantités minimales et disparaissent immédiatement sous l'influence de la vie microbienne. Les résultats du dosage sulfo-chromique pourraient alors s'interpréter directement en glycérol restant. Selon cette hypothèse, j'ai alors trouvé :

Temps en jours ..	0	7	14	21	28	35	42
Masse de glycérol à 6 p. 100 d'eau en gr.	60	60	54	47	40	34,50	26
Masse de glycérol pur en gram- mes	56,4	56,4	50,75	44,1	37,8	32,4	24,4

Ces derniers résultats sont les mêmes que ceux trouvés par la méthode de Laborde à 5 p. 100 près. L'hypothèse s'avère donc comme juste. Le dosage sulfo-chromique donne ainsi très rapidement le glycérol contenu dans mes Sautonsensemencés avec le B.C.G.

En résumé, les 13,9 g. de microbes secs ont consommé en moyenne, pour se développer, 36 g. de glycérol. Ces résultats sont conformes à ceux de Philibert et Boudin (18) qui ont trouvé qu'une culture microbienne nécessite en moyenne 35 g. de glycérol par litre.

C) INTERPRÉTATION :

Selon certains auteurs (19) le glycérol servirait par moitié d'aliment carboné pour la constitution de la matière microbienne et par moitié d'aliment énergétique.

J'ai dressé le tableau de la moitié du C disparu, dans le glycérol consommé, et du C apparu dans la matière microbienne obtenue. J'ai fait ensuite de rapport des quantités correspondantes.

Temps en jours	15	21	28	35	42
$\frac{C}{2}$ du glycérol	0,9	2,5	4,2	5	6,5
C des microbes	1,75	4	6,7	6,8	7
Rapport	0,54	0,60	0,63	0,70	0,90

Les rapports ne tendent vers 1 que dans les vieilles cultures. Il n'y a dans tout le Sauton que 1,994 de C indépendamment du C du glycérol.

Dès la 4^e semaine de la culture, le tableau précédent montre nettement que le glycérol consommé a dû fournir plus de la moitié de son carbone pour faire la matière microbienne. L'hypothèse des auteurs cités, admissible pour les vieilles cultures, ne l'est donc pas au cours du développement microbien.

D) POINT DE VUE ÉNERGÉTIQUE :

Les 36 g. de glycérol consommé correspondent à 34 g. de glycérol pur, soit à :

$$\frac{400}{3} \# \frac{1}{3} \text{ de molécule gramme}$$

La destruction de $\frac{1}{3}$ de molécule gramme du glycérol libère une énergie de :

$$\frac{400}{3} = 130 \text{ grandes Calories}$$

Les 13,9 g. de microbes secs comprennent environ 6 g. de matières grasses et 7 g. de protéines.

La valeur énergétique des matières protéiques est de 4 g. Calories par gramme, celle des matières grasses de 9 g. Calories par gramme. L'énergie nécessaire à la formation des 13,9 g. de microbes est donc environ de :

$$\left. \begin{array}{l} 7 \times 4 = 28 \\ 6 \times 9 = 54 \end{array} \right\} \text{ en tout } 82 \text{ g. Calories}$$

Au total le glycérol consommé a dû libérer une énergie supplémentaire de : $130 - 80 = 50$ g. Calories.

Pour voir si celle-ci n'était pas simplement libérée sous forme calorifique j'ai fait des cultures dans des bouteilles thermos contenant chacune 100 cm³ de Sauton. Le tout était porté à 38° C. et enfermé après ensemencement dans une étuve à 38° C. Des bouchons de feutre épais traversés par des thermomètres fermaient l'orifice des bouteilles.

En fonction du temps les températures lues sur les 3 bouteilles étudiées ont été les suivantes :

Temps	0	7	14	21	28	35	42
Température en	38	38	38,5	39,5	41,5	41,5	41,5
degrés C	38,1	38,1	39	40,5	41,5	41,7	41,7
	38	38,1	38,9	40	41,6	41,8	41,8

Au bout de 42 jours les cultures s'étaient parfaitement développées (11,5 g. de microbes secs en moyenne par litre de Sauton, pour 32 g. de glycérol consommé).

Ainsi une partie appréciable de l'énergie du glycérol consommé disparaît sous la forme calorifique. J'ai mesuré directement ainsi une perte d'énergie calorifique de 3,6 g. Calories par litre de Sauton. Une étude sommaire du refroidissement dans mes bouteilles thermos m'a permis d'envisager que le développement microbien devait dégager en tout environ 9,5 g. Calories par litre de Sauton. Les 40 grandes calories restantes ont dû servir aux réactions chimiques produites dans le liquide de Sauton par la vie microbienne à moins que tout le glycérol consommé ne se soit pas transformé en CO² et H²O.

E) INTERPRÉTATION QUANT AUX ÉCHANGES GAZEUX :

Si la moitié du glycérol consommé à la fin de la culture (17 g.) a servi d'aliment énergétique, il a dû se former du gaz carbonique et de l'eau. En cas de destruction complète de ce glycérol il serait parti 6 g. de C. sous forme de CO^2 . Chaque litre de Sauton dégagerait donc 22 g. de CO^2 en 6 semaines, soit environ 14,5 g. en $\frac{1}{4}$ semaines.

Or l'étude directe des échanges gazeux a montré qu'un litre de Sauton cultivé en B.C.G. dégageait 10 g. de CO^2 en $\frac{1}{4}$ semaines.

Tout le glycérol utilisé comme aliment énergétique ne s'est donc pas transformé en CO^2 et H^2O . J'ai trouvé effectivement que le milieu s'enrichissait en acide oxalique. Celui-ci doit être envisagé comme un produit d'oxydation intermédiaire.

En résumé, l'étude du glycérol, constituant le plus important en masse, du Sauton, permet de retrouver certains résultats connus par d'autres méthodes d'investigation.

CHAPITRE VIII

ALIMENTATION AZOTÉE

ASPARAGINE et AMMONIAC

J'ai étudié ces deux constituants du liquide de Sauton, par les méthodes de dosage suivantes appliquées à des quantités égales (20 cm³) du liquide à analyser.

1° Sur 20 cm³, un dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl selon Bertrand (20) donnait l'azote : *amidé, aminé et ammoniacal*.

2° Sur 20 cm³ une hydrolyse de l'asparagine par le procédé de Maquenne (21) transformait cet acide aminé, amidé, en aspartate d'ammonium.



Une distillation en présence de soude, permettait d'obtenir NH³ qu'il suffisait de doser avec une liqueur titrée acide.

Cet NH³ comprenait NH³ du liquide, augmenté de celui provenant de la fonction amide. J'avais donc par cette méthode l'azote amidé et ammoniacal.

3° Enfin 20 cm³ de Sauton étaient évaporés au bain marie (à moins de 50° C.) en présence de lait de chaux, ce qui chassait NH³, sans hydrolyser l'asparagine. Le résidu repris et hydrolysé selon le procédé Maquenne permettait après dosage de calculer le seul azote provenant de la fonction amide.

Par différence entre les résultats 2 et 3, j'avais l'azote ammoniacal N₃. Par différence entre les résultats 1 et 2, l'azote aminé N₁.

Le 3° résultat donnant l'azote amidé N₂, il est facile de calculer la quantité d'asparagine correspondante, en admettant que c'est la seule amide du liquide.

En retranchant N_2 de N_1 (dans l'asparagine il y a autant de N amidé que de N aminé) on obtient de l'azote aminé, qui doit être celui de l'acide aspartique qui s'est formé dans le Sauton. On peut calculer alors la quantité d'acide aspartique correspondante (acide dont la présence est reconnue par d'autres méthodes dans le Sauton).

Au total les 3 analyses précédentes permettent d'obtenir sur chaque liquide : l'ammoniac, l'asparagine et l'acide aspartique.

1^o ÉTUDE DE L'AZOTE TOTAL PAR LA MÉTHODE KJELDAHL-BERTRAND :

20 cm³ de liquide sont mesurés à la pipette (erreur 0,025 cm³) et additionnés de :

0,500 g. de $SO^4Cu, 5H^2O$
10 g. de SO^4K^2
20 cm³ de SO^4H^2cc

Le tout est chauffé lentement dans un ballon à long col pendant environ 6 heures, c'est-à-dire bien au delà de la décoloration. On obtient une belle liqueur verte transparente (due à l'ion Cu). Cette liqueur est additionnée de 200 cm³ d'eau distillée, de 4 ou 5 pierres ponce, de 50 cm³ de lessive de soude commerciale. Le ballon la contenant est adapté à un appareil de distillation d'Aubin.

Le distillat est recueilli dans une éprouvette contenant 10 cm³ d'eau distillée, additionnée d'hélianthine et teintée en rouge par adjonction d'une goutte, soit 0,05 cm³, d'une solution décimale de SO^4H^2 .

L'ammoniac arrivant dans l'éprouvette rend l'indicateur jaune. On neutralise progressivement NH^3 par addition immédiate de la solution acide décimale qui est placée au-dessus.

L'opération dure environ 30 minutes; 1 cm³ de la liqueur acide correspond à 0,0014 g. d'azote. La burette graduée permet d'apprécier facilement 0,05 cm³ (volume d'une goutte). La technique précédente est par suite capable de déceler 0,0007 g. d'azote.

a) PRÉCISION RÉELLE DES RÉSULTATS OBTENUS :

J'ai étudié comme précédemment 20 cm³ de l'eau distillée, utilisée habituellement, sur lesquels j'ai fait un Kjeldahl. J'ai eu

besoin de 0,30 cm³ d'acide décimal pour neutraliser. Ainsi ce liquide contient 0,0004 g. de N. Cet azote peut provenir de l'eau distillée ou des produits utilisés pour faire le Kjeldahl. J'ai alors étudié ces derniers au réactif de Nessler (22) afin de voir s'ils ne contiennent pas des traces d'ammoniac (1). L'examen a donné des résultats négatifs. Je n'ai jamais eu la coloration jaune décelant la présence NH³. J'ai alors cherché la présence possible de nitrate en utilisant la diphénylamine en solution sulfurique. Quelques gouttes du réactif sont placés dans un verre de montre; on y fait tomber le produit à essayer. Des traces de nitrate doivent donner une zone bleue. Les produits étudiés ne m'ont pas semblé contenir de nitrate. L'eau distillée, par contre, semble en contenir un peu.

L'azote trouvé devrait donc être attribué à l'eau distillée elle-même. Un nouveau dosage sur 40 cm³ d'eau distillée en utilisant les mêmes proportions de SO⁴Cu — SO⁴K² — SO⁴H² que précédemment donne effectivement une quantité d'azote sensiblement double : 0,0007.

L'eau distillée de l'Institut Pasteur de Tunis est vendue par un industriel de la ville, qui l'obtient comme sous-produit; cette trace d'azote est donc admissible.

J'ai retranché systématiquement des résultats obtenus par la suite 0,0004 g. qui représentent l'erreur due à l'eau distillée. Le résultat moyen étant d'environ 0,014 g. par dosage, cette correction ne représente d'ailleurs qu'une erreur relative de 3 p. 100.

b) ÉTUDE D'UN PRODUIT AZOTÉ CONNU :

J'ai alors dosé l'azote total d'une solution de 0,146 g. de ClNH⁴ (pur Poulenc) dans 30 cm³ d'eau distillée. Le ClNH⁴ avait été séché au préalable 6 heures à l'étuve à 105° C., ce qui lui donne une masse constante. J'ai eu besoin de 27,5 cm³ de SO⁴H² $\frac{N}{10}$ pour neutraliser le NH³ formé. Ce qui, toutes corrections faites, correspond à 0,0381 g. d'azote, alors que le calcul conduit à 0,0382 g. (Erreur absolue : 0,12 millig. Erreur relative < $\frac{1}{300}$).

(1) Réactif de Nessler : Mettre dans un matras jaugé d'un litre 13,55 g. de Cl²Hg pur très finement pulvérisé. Ajouter 100 cm³ d'eau distillée puis 36 g. de IK. Agiter. Compléter le volume au litre. Cette liqueur est additionnée de 300 cm³ par litre de lessive de potasse Na (OH) (D = 1,336).

J'ai étudié de même 30 cm³ d'eau distillée contenant 0,142 g. d'oxalate d'ammonium, ceux-ci ayant été desséchés 6 heures à l'étuve à 105° C. Le Kjeldahl m'a permis de constater la présence de 0,02814 g. d'azote, alors que le calcul conduisait à 0,028 g. (Erreur absolue : 0,014 millig. Erreur relative $< \frac{1}{200}$).

Enfin j'ai fait un Kjeldahl sur un Sauton. 30 cm³ de ce liquide correspondait à 24,4 cm³ de $\text{SO}^4\text{H}^2 \frac{\text{N}}{10}$

Ayant additionné les mêmes 30 cm³ de Sauton de 0,170 g. de ClNH^4 (sec) le Kjeldahl nécessite 55,9 cm³ de $\text{SO}^4\text{H}^2 \frac{\text{N}}{10}$

Tout calcul fait le ClNH^4 ajouté correspond à 0,0445 g. d'azote, l'expérience donne 0,0440 g. (Erreur relative : 1,1 %.)

Enfin l'addition de 0,142 g. d'oxalate d'ammonium sec à 30 cm³ d'un autre Sauton donne une neutralisation pour 49,21 cm³ de $\text{SO}^4\text{H}^2 \frac{\text{N}}{10}$

Les mêmes 30 cm³ de Sauton seuls sont après Kjeldahl neutralisés par 29,15 cm³ de $\text{SO}^4\text{H}^2 \frac{\text{N}}{10}$. La différence 20,05 cm³ correspond à 0,02802 d'azote, le calcul donne 0,028 g. (Erreur : 1 %.)

En résumé : La méthode de Kjeldahl m'a donné en moyenne une précision supérieure à 0,0005 g., ce qui correspond à une erreur relative maximum de 3 %.

La méthode est tout à fait acceptable pour le travail entrepris ici.

2° ÉTUDE DE LA MÉTHODE DE MAQUENNE :

Employée pour hydrolyser l'asparagine. 20 cm³ de liquide de Sauton sont additionnés de 3 cm³ de HCl concentré, et chauffés 2 heures avec un réfrigérant à reflux. Dans ces conditions l'asparagine s'hydrolyse totalement en aspartate d'ammonium (23).

Le liquide obtenu est additionné de 200 cm³ d'eau distillée, de 4 à 5 pierres ponce et de 50 cm³ de lessive de soude commerciale. Il est ensuite distillé dans l'appareil d'Aubin. NH^3 est recueilli et titré comme dans le procédé de Kjeldahl en 30 minutes.

La fonction amine de l'asparagine n'est nullement touchée au cours d'un tel traitement.

J'ai fait une solution de 0,080 g. d'asparagine dans 20 cm³ d'eau. Une telle solution contient théoriquement 0,00754 g. d'azote amidé susceptible de se transformer en ammoniac. Après traitement Maquenne et dosage, j'ai pu trouver 0,0071 g. d'azote. La même quantité d'asparagine était dissoute dans une solution ammoniacale contenant 0,0020 d'azote dans 20 cm³. J'ai pu retrouver, après Maquenne, 0,0092 g. de N, alors que le calcul conduit à 0,009154 g.

3° ÉTUDE DU TRAITEMENT A LA CHAUX PRÉCÉDANT LE TRAITEMENT A L'ACIDE CHLORHYDRIQUE :

55 cm³ du liquide de Sauton sont additionnés de 50 cm³ de lait de chaux. On évapore à sec en chauffant au bain marie à une température inférieure à 50° C. sous le vide de la trompe à eau. Dans ces conditions NH³ libre est chassé sans que l'asparagine soit hydrolysée. On reprend le résidu par l'eau distillée et on complète à 55 cm³. On filtre. Il suffit de reprendre 20 cm³ du liquide obtenu, de les traiter comme précédemment par 3 cm³ de HCl à l'ébullition afin d'hydrolyser l'asparagine et de doser l'ammoniac obtenu.

Dans ces conditions une solution de 0,080 g. d'asparagine (contenant 0,00754 g. de N) dans 20 cm³ d'eau distillée m'a donné expérimentalement 0,00718 g. de N. La même solution contenant en plus 0,008 g. d'azote sous la forme ammoniacale, m'a donné après traitement complet 0,00691 g. d'azote.

Tout le NH³ avait bien été éliminé par le traitement préalable à la chaux, sans qu'il y eût hydrolyse sensible de l'asparagine. Au total les 2 traitements Maquenne m'ont donné une précision moyenne de l'ordre de 10 %.

4° ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION, EN FONCTION DU TEMPS, DES SUBSTANCES AZOTÉES DU SAUTON :

J'ai appliqué les méthodes précédentes chaque semaine sur mon Sauton moyen obtenu par mélange de 3 ballons. Le tableau suivant donne la moyenne des divers résultats.

J'y mentionne les quantités d'acide sulfurique décimal neu-

tralisant l'ammoniac obtenu chaque fois, à partir de 20 cm³ de liquide.

Temps en jours ..	0 avant autoclave	7	14	21	28	35	42
Kjeldahl	19,28	17,50	14,29	9,65	4,65	4,30	4,10
Maquenne A	13,90	12,20	12	8,20	3,50	3,35	3,20
Maquenne B	5,38	3,04	1,12	0,48	0,40	0,30	0,28

Il faut remarquer que la précision des mesures diminue dans le temps, puisque la quantité d'acide utilisé devient de plus en plus petite. Alors que sur les premiers Kjeldahls l'erreur relative est de 3 %, elle est de 10 % environ sur les Kjeldahls des liquides de 42 jours. Pour les Maquennes la précision passe de 4 % à 15 %.

Pour conserver la même précision j'aurais dû augmenter mes quantités de liquide prélevé pour analyse, au fur et à mesure que celui-ci s'appauvissait en azote. C'était peu pratique pour diverses raisons expérimentales. D'autre part, comme j'étudie ici l'évolution relative des substances azotées, les résultats précédents sont suffisants.

Remarque : Pour le calcul des substances azotées par litre de Sauton, j'ai tenu compte de la perte de masse des liquides dans l'étuve. Celle-ci crée, surtout par perte de vapeur d'eau, une concentration qui cause une erreur importante. Dans de très vieux Sautons il reste par exemple 963 g. de liquide, là où il y en avait 1.000 g. au départ.

a) INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS :

Au cours de la vie microbienne, il apparaît dans le Sauton de l'acide aspartique, comme je le montrerai par la suite.

En admettant que l'asparagine se soit hydrolysée en acide aspartique et que les seules substances azotées du milieu soient, au cours de la culture du B.C.G., de l'asparagine, de l'acide aspartique et

de l'ammoniac, le tableau suivant donne la répartition de l'azote entre les 3 constituants (1) :

Temps en jours ..	0	7	14	21	28	35	42
En milligrammes							
Azote							
Aminé :							
Asparagine	377	211	78	30	26	20	19
Ac. aspartique ..		158	83	66	52	43	42
Amidé :							
Asparagine	377	211	78	30	26	20	19
Ammoniacal ..	600	641	758	530	215	208	194

Ce tableau permet de calculer facilement les quantités existantes d'asparagine, d'acide aspartique et d'ammoniac dans le Sauton en fonction du temps (fig. 10).

Masses en grammes

Temps	0	7	14	21	28	35	42
Asparagine	4 g.	2,2	0,8	0,33	0,26	0,21	0,18
Ac. aspartique ..		1,7	0,86	0,72	0,55	0,45	0,44
Ammoniac	0,726	0,776	0,918	0,650	0,260	0,251	0,234

En une dizaine de jours les 3/8 de l'asparagine se sont hydrolysés en acide aspartique.

Par suite il s'est formé de l'ammoniac aux dépens de la fonction amide selon l'équation :



Cela explique le réenrichissement du Sauton en ammoniac libre

(1) Les matières protéiques sont en quantités extrêmement faibles dans les Sautons (0,3 g. par litre). Elles peuvent être négligées quant aux calculs sur l'azote, puisqu'il n'y en a que 0,3 g. pour des cultures d'au moins 6 semaines.

au début de la culture. L'acide aspartique est ensuite consommé entre le 7^e et le 15^e jour. De même l'ammoniac disparaît rapidement à raison de 300 milligrammes par semaine, quand la masse microbienne se développe abondamment, c'est-à-dire entre le 14^e et le 28^e jour. Ces résultats sont en accord avec ceux de Lobs-
tein (24).

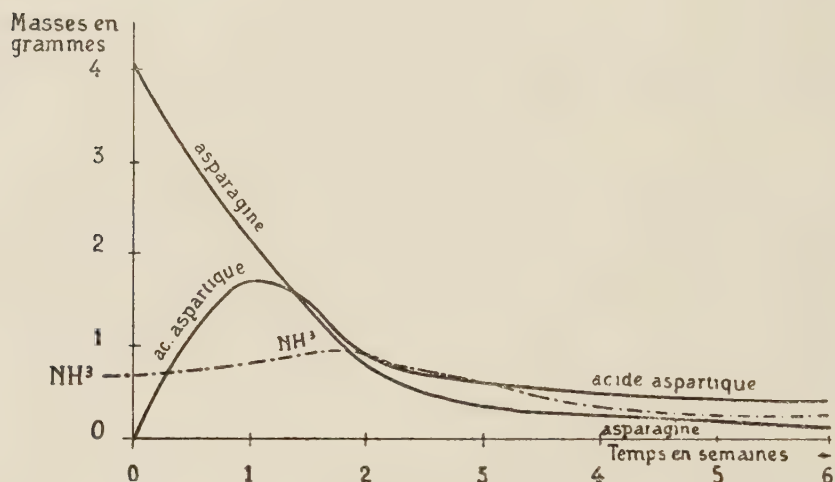


FIG. 10. — Evolution de la concentration en asparagine, acide aspartique et ammoniac en fonction du temps.

On peut remarquer que la concentration en ammoniac libre correspond sensiblement à l'évolution du pH du Sauton en fonction du temps. Le pH devient basique passant de 7,3 à 7,5 en même temps que l'ammoniac du milieu passe de 0,726 g. à 0,918 g. Le pH devient acide passant de 7,5 à 6 en même temps que la quantité d'ammoniac passe de 0,918 g. à 0,234 g.

b) AZOTE TOTAL DES MICROBES :

Afin de préciser le problème de l'évolution azotée, j'ai étudié aussi l'azote total des microbes. Ceux-ci étaient recueillis par filtration et séchés comme je l'ai déjà indiqué, jusqu'à masse constante. Je faisais alors des prises d'essai de 0,500 g. de microbes secs que je traitais par la méthode de Kjeldahl. Les pourcen-

tages d'azote paraissent varier légèrement en fonction du temps chez les microbes secs :

Temps	7	14	21	28	35	42
N p. 100 chez						
les microbes ..	7,19	7,10	6,9	7,1	7	6,85

Le minimum observé vers la 3^e semaine est probablement en relation avec l'observation déjà citée (14) selon laquelle les microbes de cet âge contiennent un pourcentage maximum de matière minérale. Il est par suite normal que le pourcentage des matières protéiques, donc de l'azote, soit minimum vers la même époque.

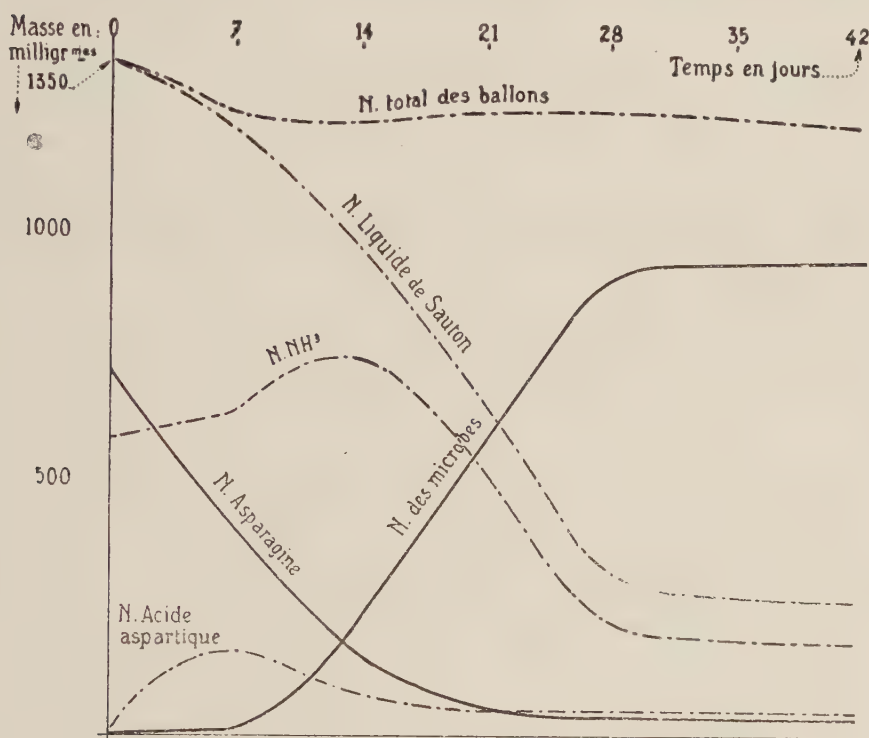


FIG. 11. — Répartition de l'azote entre les microbes et le milieu pendant la culture.

Quant au pourcentage, plus faible dans les vieilles cultures, il s'explique par l'appauvrissement notable du Sauton de 42 jours,

en azote. Les nouveaux microbes formés à ce moment-là s'adaptent au milieu et contiennent moins d'azote.

En prenant comme pourcentage moyen de l'azote dans les microbes du B.C.G. 7 %, le tableau suivant résume la répartition de l'azote en fonction du temps dans les ballons (fig. 11) :

Temps en jours ..	0	7	14	21	28	35	42
<i>N des microbes</i> ..	0	0,025	0,245	0,595	0,933	0,954	0,972
	Avant autoclave						
<i>N du milieu</i>	1,350	1,221	0,997	0,657	0,319	0,292	0,275
<i>N contenu dans :</i>							
Asparagine	0,744	0,422	0,156	0,060	0,052	0,040	0,038
Ac. aspartique		0,158	0,083	0,066	0,052	0,043	0,042
NH ³	0,600	0,641	0,758	0,530	0,215	0,208	0,194
<i>N total dans le ballon</i>	1,350	1,246	1,242	1,252	1,252	1,246	1,247

c) ÉCHANGES AZOTÉS :

Les microbes utilisent surtout entre le 7^e et le 14^e jour l'azote de l'asparagine et de l'acide aspartique.

Bilan { Perte de N chez les 2 corps précédents : 341 milligr.
Gain de N chez les microbes : 220 milligr.

Coefficient d'utilisation : $\frac{341 - 117}{220} = 1.$

Entre le 14^e et le 28^e jour ils utilisent surtout l'azote de l'ammoniac.

		2 ^e à 3 ^e semaine	3 ^e à 4 ^e semaine
Bilan {	Perte de N chez l'ammoniac :	228	315
	Gain de N chez les microbes :	350	338
Coefficient d'utilisation :		0,61	0,92

Ces résultats semblent en accord avec ceux de E. A. Sym (25) qui a étudié l'assimilation de l'azote par des bacilles tuberculeux bovins lors de passages successifs sur le milieu de Sauton.

Cet auteur a trouvé que le bacille tuberculeux bovin utilise l'asparagine et l'acide aspartique lors du 1^{er} passage et que lors des 2^e et 3^e passages il utilise bien mieux l'ammoniac.

Au cours d'un même passage sur Sauton, j'observe, en effet, la même évolution, dans l'adaptation du bacille de Koch aux conditions nutritives.

5^e ÉTUDE D'UNE PERTE D'AZOTE DANS LES BALLONS :

Il est curieux de constater que les ballonsensemencés renferment au total 100 milligrammes d'azote de moins que le Sauton initial avant la stérilisation à l'autoclave.

Cette différence peut évidemment s'expliquer par des pertes de liquide, inévitables lors de la séparation des microbes, du liquide par filtration. Ayant évalué ces pertes (filtres compensés, pesés, etc...) elles ne suffisent pas à expliquer la diminution de l'azote total.

D'autre part, j'ai trouvé que des Sautons témoins conservés 1 mois à l'étuve 37° C. perdent eux aussi de l'azote et en perdent même bien plus de 100 milligrammes.

Ce qui faisait que, ayant préparé 2 ballons identiques, l'un étantensemencé en B.C.G., l'autre conservé comme témoin, le 1^{er} contenait un azote total (microbes + liquide) supérieur au 2^e au bout d'un séjour de 25 jours à l'étuve 37° C. pour les 2 ballons.

Afin de préciser cette perte d'azote, tout en évitant toute manipulation inutile, j'ai préparé 6 ballons à long col pour Kjeldahl contenant chacun 30 cm³ de Sauton.

Chacun des ballons futensemencé en surface avec du B.C.G. de façon aussi égale que possible. Un Kjeldahl immédiat sur 2 des ballons montre qu'ils contiennent respectivement : 0,0385 g. et 0,03825 g. d'azote.

Après 14 jours d'étuve à 37° C. deux autres ballons contiennent en tout : 0,03794 g. et 0,03766 g. d'azote.

La perte d'azote est donc de 0,5 milligr. en moyenne. Après 28 jours d'étuve à 37° C. les 2 derniers ballons contiennent 0,03769 g. et 0,03799 g. d'azote. Soit une perte moyenne de 0,6 milligr. de N.

Il semble donc que la perte d'azote se produise surtout au début

de la culture, puisqu'elle n'a presque pas augmenté alors que le temps a doublé.

Lors de la préparation du Sauton, celui de pH 7,3, est réparti, à raison de 300 cm³ par ballon. Un Kjeldahl immédiat donne 1,354 g. d'azote par litre. Les traitements Maquenne permettent de retrouver que cet azote se répartit ainsi : 0,600 g. dans l'ammoniac, 0,754 g. dans l'asparagine. Les ballons de Sauton venant d'être préparés sont alors stérilisés à l'autoclave.

A la sortie de l'autoclave, le N total a diminué, le pH est en moyenne 7,2 (7,1 même parfois). L'asparagine est déjà faiblement hydrolysée en aspartate d'ammonium. Sur des témoins nonensemencés conservés à l'étuve 37° C., l'hydrolyse de l'asparagine continue. Très lente pendant les 3 premières semaines, elle s'accuse ensuite assez brusquement. Il y a alors perte d'azote. C'est le moment où le témoin a une perte gazeuse anormale. Puis le pH baisse.

Un ballon témoin, conservé 8 semaines à 37° C., a ainsi un pH égal à 6,9 et ne possède plus que les 3/5 de son asparagine initiale, tandis que l'azote total est de 1,150 g.

Dans le Sauton de la même série, ensemencé, l'hydrolyse de l'asparagine se produit durant les 10 premiers jours de la culture. C'est durant cette période que le pH devient basique et qu'il y a perte d'azote. Il semble donc que les microbes catalysent la réaction d'hydrolyse amorcée dans l'autoclave.

Afin de préciser cette action j'ai prélevé du liquide sur des ballons ensemencés depuis 3 semaines avec le B.C.G. Après filtration sur bougies Chamberland le filtrat fut ajouté, à raison de 5 cm³, à deux flacons contenant 100 cm³ de Sauton chacun. L'hydrolyse de l'asparagine de ces flacons s'est alors produite en 10 jours comme si mes prises de 5 cm³ avaient contenu un catalyseur sécrété par les microbes.

CHAPITRE IX

ÉTUDE DES PRODUITS FORMÉS DANS LE SAUTON

I. — ACIDES : ESSAIS DE PRÉCIPITATION.

J'ai utilisé la méthode suivante. Je laissais les liquides précipitants 24 heures en présence, au repos. Je centrifugais. Je desséchais le précipité 6 heures à l'étuve à 105° C. Je pesais alors le précipité sec obtenu.

A) PRÉCIPITATION AU MERCURE.

En milieu alcalin (addition d'une goutte de soude) les solutions de phosphate bipotassique, de sulfate de magnésium, d'acide citrique, d'asparagine donnent chacune un précipité avec une solution d'acétate mercurique. En présence de glycérol les précipités se forment encore. Le glycérol seul ne donne évidemment aucun précipité avec l'acétate de mercure.

Ayant fait des solutions dans les proportions mêmes du Sauton, le tableau suivant résume une série d'essais préalables :

Solutions de 50 cc. de :

Pesée Calculs Erreur

$SO^4Mg_7H^2O$ à 0,5 pour 1.000 $\rightarrow$ sulfate de Mg. 0,029 0,030 4 %

PO^4K^2H à 0,5 pour 1.000 $\rightarrow$ phosphate de Hg 0,052 0,056 8 %

acide citrique à 2 p. 1.000 $\rightarrow$ citrate de Hg 0,235 0,232 1 %

acide citrique à 2 p. 1.000 + glycérol 50 p. 1.000 $\rightarrow$ citrate de Hg 0,250 232 6 %

asparagine à 4 p. 1.000 $\rightarrow$ asparaginate de Hg 0,300 0,309 3 %

asparagine à 4 p. 1.000 + ac. citrique à 2 p. 1.000 $\rightarrow$ asparaginate de Hg + citrate 0,533 0,541 2 %

asparagine à 4 p. 1.000 $\rightarrow$ asparaginate de Hg + citrate 0,493 0,541 10 %

acide citrique à 2 p. 1.000

glycérol à 60 p. 1.000

Sauton neuf $\rightarrow$ $\left. \begin{array}{l} \text{citrate} \\ \text{asparaginate} \\ \text{sulfate} \\ \text{phosphate} \end{array} \right\} \text{de Hg}$ 0,671 0,627 6 %

Sauton $\rightarrow$ 0,595 0,627 7 %

Sauton $\rightarrow$ 0,665 0,627 5 %

En résumé, à 7 % près, le mercure permet de précipiter quatre des éléments initiaux du liquide de Sauton.

J'ai alors étudié cette précipitation durant les 6 semaines de la culture.

Le tableau suivant donne des résultats moyens rapportés à 1 litre de Sauton.

Temps en jours	0	7	14	21	28	35	42
Précipités au Hg	12,4	8,9	8,7	10,2	9,9	7,9	7,9

Or les précipités dus à l'asparagine, à l'acide citrique, au sulfate et au phosphate, calculés d'après les résultats déjà signalés, auraient dû être en fonction du temps :

12,4	7,8	6,2	5,6	4,7	4,2	4,1
------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Les précipités mercuriques dus à des acides ou à des protéines, créés dans le Sauton sous l'influence de la vie microbienne, sont donc de :

Temps en jours	0	7	14	21	28	35	42
Précipités dus à des corps nouveaux	0	1,1	2,5	4,6	5,2	3,7	3,7

Il y a passage par un maximum vers la quatrième semaine. Il se forme donc des produits qui disparaissent ensuite partiellement.

Recherche des protéines. — Les matières protéiques précipitent par le mercure. J'ai essayé de retrouver dans mes Sautons les protéines signalées et étudiées par Sandor (26). J'ai appliqué la technique même de cet auteur.

Des essais préalables sur un Sauton stérile, même concentré au 1/10, ont été négatifs.

Ayant repris une culture de 6 semaines de B.C.G. en Sauton; je l'ai filtrée sur bougie Chamberland L2.

1° Le filtrat précipite par addition d'une solution saturée de sulfate neutre d'ammonium. Après un repos de 24 heures, le

liquide est centrifugé et le précipité séparé. Ce dernier, repris par l'eau, se dissout.

2° La nouvelle solution précipite en blanc par addition d'acide trichloracétique.

3° Filtré, le filtrat donne un précipité abondant avec l'acide phosphotungstique.

Au total le Sauton cultivé en B.C.G. contient donc bien des protéines.

Mais Sandor signale (26) des formations de 0,28 g. de protéine par litre de Sauton vieux de 6 semaines.

Il y aurait aussi formation de lécithines, tous ces corps, protéines et lécithines, étant intimement liés à l'apparition de la tuberculine.

Ayant essayé les réactions de Heller (1), celle du biuret (2) et celle de Millon (3), sur mon Sauton de 6 semaines, elles furent négatives.

Après concentration au 1/10 du même Sauton, par chauffage au bain-marie sous le vide, les réactions précédentes furent au contraire assez nettes.

Au total les protéines formées sont en petites concentrations. Je puis admettre le résultat de Sandor : 0,28 g., mais ces protéines ne sont pas en quantités suffisantes pour expliquer les importants précipités obtenus avec le mercure. Il faut donc admettre la formation d'acides organiques précipitant par le mercure, dont la concentration est maximum vers la 4^e semaine de la culture.

Ensuite ces acides sont à leur tour partiellement détruits, néanmoins leur concentration finale, qui semble constante, contribue à expliquer le pH final égal à 6 de mes Sautons.

B) PRÉCIPITATION AU CALCIUM.

J'ai d'abord fait des essais de précipitation à la température d'ébullition de l'eau, avec l'eau de chaux saturante. Le citrate et le phosphate précipitent même en présence du glycérol.

(1) Réaction de Heller : Anneau blanc au contact d'un liquide contenant matière albuminoïde et NO^2H .

(2) Réaction du biuret : Liquide étudié + grand excès de $\text{Na}(\text{OH})$. On ajoute solution très diluée de SO^4Cu . Coloration bleu violacé ou rose.

(3) Réaction de Millon : En milieu acide coloration rouge par NO^2H en présence de $(\text{NO}^3)^2\text{Hg}$.

Sur 50 cm³ de Sauton neuf, alors que le calcul conduit à la formation théorique de 0,154 g. de précipité sec, j'ai trouvé : 0,144 g. — 0,145 g. — 0,147 g., soit une erreur de 6 %.

Le sulfate de calcium et l'asparaginate de calcium ne précipitent pas, leurs concentrations étant trop faibles.

Le citrate de calcium étant, d'autre part, totalement insoluble dans l'eau bouillante, j'ai adopté finalement la technique suivante :

a) 50 cm³ de Sauton sont additionnés de 50 cm³ d'eau de chaux à froid; après un repos de 24 heures et une centrifugation, le précipité est séparé, séché, pesé.

b) Le filtrat est alors porté à l'ébullition et additionné d'un volume égal d'eau de chaux bouillante. Le nouveau précipité obtenu après une ébullition prolongée est séparé, séché et pesé.

En totalisant les masses des 2 précipités obtenus en a) et b) j'ai trouvé des totaux de 0,152 g., alors que le précipité théorique était de 0,154 g. dans les mêmes conditions.

Résultats : Masse totale des précipités de calcium obtenus avec des Sautons cultivés de 1 à 6 semaines en B.C.G.

Temps	0	7	14	21	28	35	42
Masse	2,9	4,7	4,9	4	3	2,3	2,2

Si l'on retranche de ces résultats les masses de citrate et de phosphate de calcium déterminés grâce aux résultats déjà obtenus, les précipités au calcium dus à des corps nouveaux sont, en fonction du temps :

0	3,6	4,2	3,5	2,6	1,9	1,9
---	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Là encore on retrouve un passage par un maximum. Il se forme donc des acides qui se détruisent encore partiellement. Comme avec les précipités au mercure, on trouve là que l'ensemble des acides précipitants n'évolue presque plus à partir de la 5^e semaine. On peut remarquer que c'est la période où la masse microbienne est sensiblement constante.

C) RECHERCHE DES ACIDES FORMÉS.

a) Appliquant la technique de Mestrezat (27), j'ai retrouvé de l'acide succinique dans des Sautons ensemencés depuis quinze et vingt et un jours avec le B.C.G.

b) D'autre part, m'étant procuré les acides aspartique et succinique purs (produits Merck), j'ai fait des cristaux d'aspartate et de succinate de calcium par les deux méthodes suivantes :

1° Par neutralisation directe à l'eau de chaux et repos prolongé (5 jours au moins);

2° Par formation d'aspartate et de succinate de sodium et addition de solution de chlorure de calcium.

3° Ensuite j'ai appliqué les mêmes traitements à des Sautons ensemencés avec du B.C.G.

Dans les Sautons ensemencés depuis 7 ou 14 jours il se forme plusieurs types de cristaux prismatiques.

— Les uns paraissent analogues aux cristaux d'aspartate de calcium obtenus par traitement de l'aspartate de sodium par le chlorure de calcium.

— Les autres sont très semblables au succinate de calcium obtenu par l'action de l'eau de chaux sur l'acide succinique. Il y aurait, semble-t-il, dans mes Sautons de 7 à 14 jours les acides aspartique et succinique (ce dernier déjà obtenu par la méthode de Mestrezat).

Dans les cultures de semaines 4 semaines et plus de B.C.G. en Sauton, il n'y a plus qu'une forme cristalline apparente.

M. le Professeur de minéralogie Royer, de la Faculté d'Alger, a eu la très grande obligeance de me déterminer ces cristaux au microscope polarisant.

« Ce sont des cristaux prismatiques à allongement modéré. Ils sont à extinction droite et à allongement positif. Quelques rares cristaux montrent une échancrure aux deux pointements du prisme. Les propriétés optiques de ces cristaux échancrés sont identiques à celles des cristaux prismatiques. On peut être certain que dans ce liquide de Sauton de plus de 4 semaines, il n'y a qu'une seule sorte de cristaux. »

Ces cristaux sont identiques à ceux qu'on obtient par action de CaCl^2 sur l'acide oxalique. Ce sont des cristaux d'oxalate de cal-

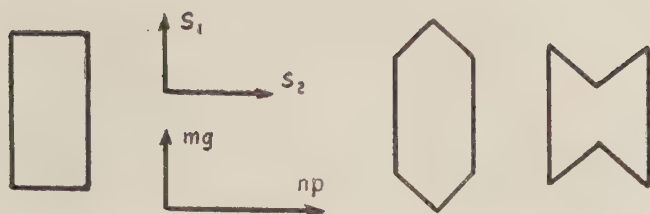


FIG. 12. — Cristaux d'oxalate de calcium.

cium. Ainsi les vieux Sautons ne contiennent plus que de l'acide oxalique (fig. 12).

D) *ÉTUDE QUALITATIVE DES PRÉCIPITÉS OU DES COLORATIONS OBTENUES AVEC UNE SOLUTION SATURÉE D'ACÉTATE DE CUIVRE.*

J'ai repris en même temps 7 Sautons,ensemencés respectivement depuis 0, 7, 14, 21, 28, 35 et 42 jours avec du B.C.G.; j'ai filtré séparément ces liquides.

10 cm³ de chacun d'eux furent additionnés de

1 cm³ d'une solution saturée d'acétate de cuivre.

Immédiatement une gamme colorée se forme, la teinte évoluant du bleu foncé au vert très clair.

Temps	0	7	14	21	28	35	42
Teinte	Bleu outremer	Bleu	Bleu clair	Vert d'eau	Vert d'eau + clair	Vert clair	Vert très clair

Ayant fait des solutions à 2 p. 100 d'asparagine, d'acide aspartique, d'acide succinique, d'acide citrique, d'acide maléique, je les ai additionnées au 1/10 d'une solution saturée d'acétate de cuivre, des colorations très différentes s'établissent :

L'asparaginate de cuivre est bleu outremer.

L'aspartate de cuivre est bleu.

Le succinate de cuivre est vert.

Le maléate de cuivre est vert.

Le citrate de cuivre est vert très clair.

Ainsi l'évolution de la teinte de mes Sautons après traitement à l'acétate de cuivre s'interprète bien en admettant la transformation de l'asparagine en acide aspartique, puis en acide succinique. En calculant alors les précipités de calcium et de mercure obtenus avec ces acides issus de l'asparagine, je trouve des résultats inférieurs à ceux observés.

Il faut donc en conclure, qu'outre ces acides, il s'en forme d'autres aux dépens d'autres constituants du Sauton.

II. — FORMATION D'UNE SUBSTANCE RÉDUCTRICE

Le liquide de Sauton stérile n'est nullement réducteur; or une substance réductrice se crée peu à peu si on ensemence ce Sauton avec le B.C.G.

a) Cette substance réduit :

la liqueur de Fehling (1);

le nitrate d'argent ammoniacal;

le réactif de Nylander au sous-nitrate de bismuth (2);

le réactif iodo-mercurique de Sachs (3).

b) Elle n'est pas précipitable par les liquides de défécation habituels : acétate de plomb, réactif mercurique de Patein, métaphosphate de sodium, etc... Le milieu déféqué est toujours réducteur.

c) Elle n'est pas volatile. Si on distille le liquide de Sauton sous pression réduite, elle se concentre dans le résidu, tandis que le liquide obtenu par distillation n'est nullement réducteur.

ÉTUDE DE CETTE SUBSTANCE RÉDUCTRICE :

1° *Nature.* — Concentrée, la substance réductrice est dextrogyre. Elle ne paraît pas fermentescible.

Ayant de suite envisagé l'hypothèse d'un glucide, les réactions

(1) Liqueur de *Fehling* : $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot \text{H}_2\text{O}$: 40 g.; NaOH : 130 g.; sel de Seignette : 160 g.; eau distillée q. s. p. 1.000 cm^3 .

(2) Réactif de *Nylander* : Sous-nitrate de bismuth 2 g.; sel de Seignette 4 g.; soude caustique 10 g.; H_2O q. s. p. 100 cm^3 .

(3) Réactif du type « *Sachs* » : Iodure mercurique 3 g. 60; IK 15 g.; K (OH) 3 g.; eau q. s. p. 100 cm^3 .

à l'acétate d'aniline, à l'orcine, à la résorcine ne m'ont jamais donné de furfural, ni de dérivé furfurique. Ce ne serait donc pas un glucide en C⁵.

J'ai alors étudié l'osazone de ce glucide probable. J'ai d'abord séparé la substance réductrice des matières albuminoïdes par défécation du Sauton à l'aide du réactif mercurique de Patein et Dufau (1).

Celui-ci est additionné progressivement jusqu'à ce qu'il ne précipite plus. La liqueur est alors rendue d'abord basique par addition de soude, puis légèrement acide par addition d'acide acétique. Une filtration sépare les matières albuminoïdes, le liquide obtenu contient la matière réductrice.

J'ai alors préparé une osazone avec ce liquide, conformément aux indications de Wattiez et Sternon (28).

100 cm³ du liquide sont additionnés de 20 cm³ d'une solution acétique de phénylhydrazine (10 g. de phénylhydrazine, 10 cm³ d'acide acétique glacial, eau q.s.p. 100 cm³). L'ensemble est chauffé une heure au bain-marie. On laisse refroidir. On filtre. Le précipité est lavé au benzène et à l'eau froide. Ce précipité étant soluble dans l'alcool méthylique et dans l'acétone, j'ai pu obtenir par dissolutions et cristallisations successives une osazone pure nettement cristallisée.

Cette osazone affecte la forme de marrons plus ou moins chevelus analogues à ceux représentés fig. 4, p. 105, dans l'ouvrage de Polonovski (29), à propos de la phényllactosazone.

D'autre part, ayant pris le point de fusion de l'osazone obtenue au bloc de Maquenne, j'ai trouvé qu'il était voisin de 200°. Je dois signaler enfin que cette osazone est soluble dans l'eau bouillante.

Ma substance réductrice peut donc être du lactose. J'ai alors repris l'étude directe de cette oside réductrice sur le liquide obtenu après défécation du Sauton au réactif de Patein.

Après un essai d'hydrolyse à l'aide de divers acides minéraux dilués, j'ai pu constater que le pouvoir réducteur devenait plus grand. Il y avait bien eu hydrolyse d'une oside dans mon liquide. Sur le liquide hydrolysé, j'ai alors recommencé le traitement à la phénylhydrazine. J'ai obtenu cette fois deux formes cristallisées

(1) Patein et Dufau : 160 cm³ de NO³H (40B) + 220 g. d'oxyde rouge de Hg. Au bout de 6', ajouter 160 cm³ d'eau distillée.

Ebullition; après dissolution totale, addition de 40 cm³ de lessive de soude au 1/4. On complète à 1 litre avec de l'eau distillée.

d'osazones. L'une est très nettement de la glucosazone (forme en branches de genêts) (29), l'autre m'était inconnue.

J'ai alors hydrolysé du lactose pur et fait les osazones des oses obtenues (galactosazone et glucosazone). J'ai pu identifier mon osazone inconnue comme de la galactosazone. Au total, mon glucide inconnu serait un diholoside : du lactose.

Cette interprétation est d'accord avec la thèse de Lobstein (24). Selon cet auteur le bacille tuberculeux se développe bien dans les milieux synthétiques contenant des glucides simples qu'il utilise comme aliment. Il ne se développe plus dans les milieux ne contenant que des polyholosides, qu'il ne peut assimiler.

2° *Étude quantitative.* — J'ai utilisé la méthode de G. Bertrand (30). La liqueur sucrée est soumise à l'ébullition au contact d'un excès de liqueur cuprique alcaline. L'oxyde cuivreux est recueilli sur amiante et dissous ensuite dans une solution de sulfate ferrique dont une partie est transformée en sulfate ferreux. On dose par une solution de MnO^4K .

Sur des prises de 20 cm³ Sauton, les volumes de permanganate à 5 % utilisés selon l'âge des Sautons sont les suivantes :

Temps	0	7	14	21	28	35	42
Solution MnO^4K à							
5 %	0 cm ³	0,10	0,20	0,30	0,40	0,60	1 cm ³

Ce qui, traduit en cuivre réduit, donne en milligr. de Cu :

1	2	3	4	6	10
---	---	---	---	---	----

Dans l'hypothèse du lactose, ces chiffres correspondent à des masses de lactose en milligrammes égales à :

0,76	1,52	2,28	3,04	4,56	7,6
------	------	------	------	------	-----

En ramenant ces résultats à 1 litre de Sauton les masses de lactose sont ainsi, en grammes de :

0,045	0,090	0,135	0,180	0,228	0,450
-------	-------	-------	-------	-------	-------

Ainsi le lactose n'est pas un produit de transition, puisqu'il s'accroît régulièrement à mesure que se développe la culture pour atteindre sensiblement un demi-gramme par litre dans les cultures de 6 semaines.

CHAPITRE X

INTERPRÉTATION CHIMIQUE DES RÉSULTATS PRÉCÉDENTS

Il faut maintenant essayer de préciser l'évolution chimique du Sauton au cours de la vie du B.C.G. à l'aide des résultats obtenus.

On peut remarquer tout d'abord que le Sauton fournit aux microbes en quantités importantes les 9 éléments suivants :

6 métalloïdes : H — O — S — N — P — C.

3 métaux : K — Mg — Fe.

Selon les travaux de nombreux auteurs, entre autres de Sachs, Knops, Stohmann, Noble, etc... (31), ces éléments « paraissent nécessaires et suffisants » au développement et à l'entretien des microbes.

En fait, d'autres éléments à l'état de traces peuvent être aussi nécessaires. En négligeant ces infiniments petits chimiques, que je n'ai pas étudiés dans ce travail, la réserve alimentaire totale mise à la disposition des microbes dans le Sauton est établie dans le tableau suivant :

En grammes par litre	C	O	H	N	S	Mg	P	K	Fe
Asparagine	1,296	1,296	0,216	0,754					
Glycérol	23,477	31,304	5,217						
Ac. citrique	0,685	1,219	0,095						
NH ³			0,128	0,600					
SO ⁴ Mg		0,128			0,064	0,048			
PO ⁴ K ² H		0,182	0,002				0,088	0,224	
Citrate de fer ammo- niacal	0,013	0,021	0,001	0,002					0,008
	25,471	34,150	5,659	1,356	0,064	0,048	0,088	0,224	0,008

Il y a en outre importante contribution de l'oxygène de l'air (25 g. d'O environ).

Avec tous ces matériaux, il va s'édifier environ 13,2 g. de matière sèche microbienne, ce qui correspond sensiblement à 70 g. de microbes humides. Corrélativement les produits constitutifs du Sauton sont détruits. Les courbes ci-après donnent la consommation des différents aliments fournis aux microbes en fonction du temps (fig. 13).

J'ai tracé en même temps la courbe du développement microbien.

Cette dernière courbe permet de distinguer 2 phases :

a) Du 1^{er} au 28^e jour de la culture il y a constitution de la matière microbienne, qui se développe rapidement.

b) Il y a seulement, ensuite, entretien de la masse microbienne qui ne s'accroît presque plus.

Or, si l'on fait abstraction de la courbe de consommation du glycérol, toutes les autres, qu'il s'agisse de la consommation des aliments ou de la formation des précipités métalliques, présentent nettement 2 parties :

L'une possède des anomalies et correspond dans le temps à la période de développement microbien.

L'autre reste sensiblement constante en ordonnées et est relative à la période d'entretien de la masse microbienne.

I. — PÉRIODE DU DÉVELOPPEMENT MICROBIEN.

Le développement microbien se produit pendant un laps de temps où le pH nettement basique passe même par un maximum.

Au bout du 28^e jour il s'est formé 13,3 g. de microbes secs. La constitution des microbes de B.C.G. est assez bien connue; en faisant une moyenne des résultats publiés, on peut admettre que les microbes contiennent :

	C	H	N	O	S	Mg	P	K
Masses en grammes..	6,7	1,28	1,15	4,1	0,02	0,008	0,06	0,06

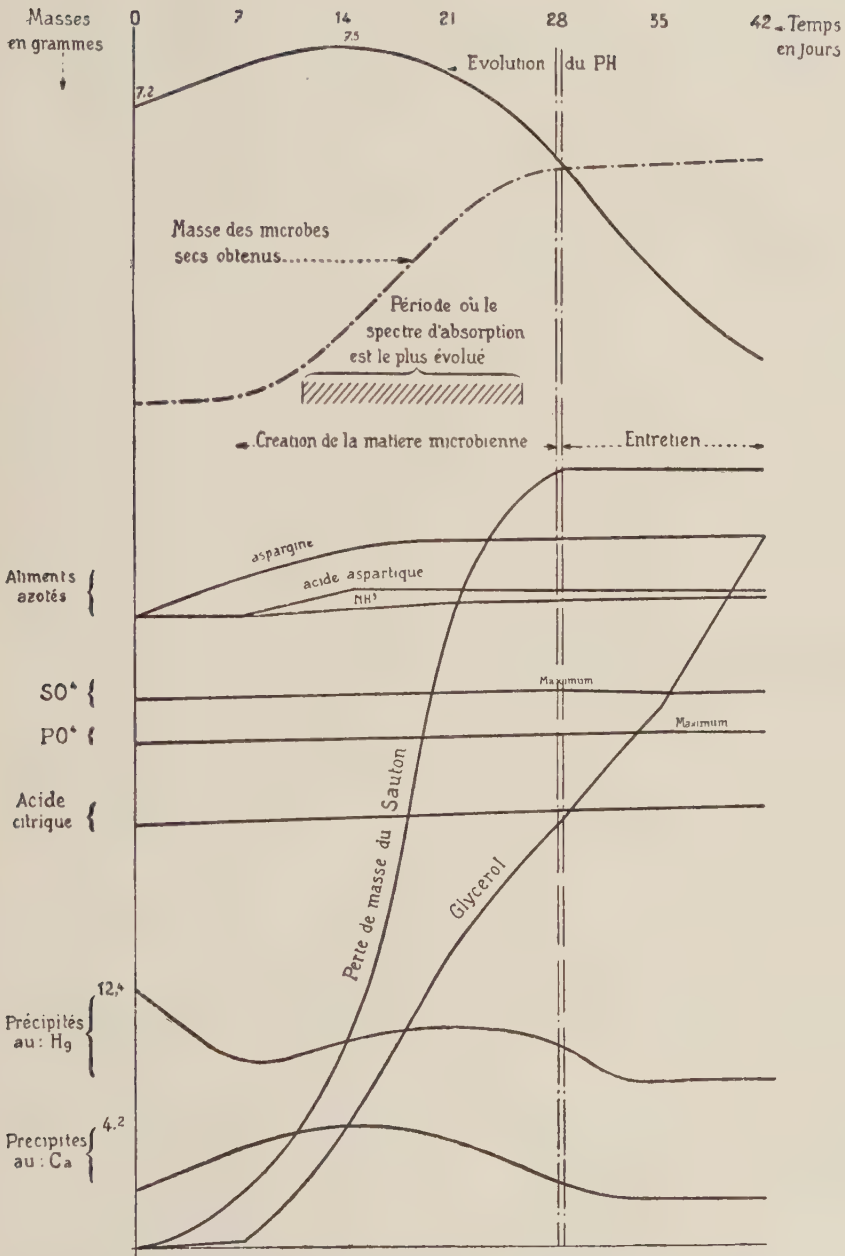


FIG. 13. — Evolution des éléments constitutifs du Sauton en fonction du temps.

Or il a disparu à la même époque sous forme d'aliments :

	C	H	N	O	S	Mg	P	K
19/20 de l'asparagine	1,21	0,2	0,75	1,21				
1/3 du glycérol	7,8	1,7		14,4				
2/5 de l'acide citrique	0,24	0,03		0,3				
2/3 NH ³		0,084	0,400					
SO ⁴ Mg				0,06	0,03			
PO ⁴ K ² H		0,001		0,06				
	9,25	2,015	1,15	12,03	0,03			

BILAN DES 4 ÉLÉMENTS PRINCIPAUX :

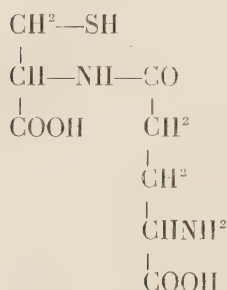
Carbone. — Il manque 2,54 g. de C. Ils correspondent à un dégagement de 9,64 g. de CO². Or l'étude directe de la respiration m'a donné un dégagement de 10 g. de CO². Ces deux résultats sont en bon accord.

Hydrogène. — Il manque 0,7 g. d'hydrogène. En admettant la formation d'eau, cela a nécessité une consommation d'oxygène de 5,6 g.

Azote. — Il y a accord entre l'azote disparu dans le Sauton et celui apparu dans les microbes.

Oxygène. — Il en faut : 7,1 g. pour faire le CO² dégagé, 5,6 g. pour faire l'eau envisagée; les microbes contiennent 4,1 g. d'O.

Au total, il faut au moins 16,8 g. d'O alors que le Sauton n'a fourni que 12 g. Il faut que nécessairement l'atmosphère ait fourni au moins 4,8 g. Si, de plus, le reste du Sauton s'est oxydé, la fourniture d'O par l'atmosphère a dû être encore plus importante. C'est effectivement ce que j'ai obtenu par l'étude de la respiration. Au total l'étude directe des éléments montre que les produits disparus se retrouvent presque intégralement dans la matière des microbes et dans les produits de la respiration. Il n'a pas pu se former des quantités importantes de corps nouveaux,



Selon la technique indiquée par P. Thomas (35) le glutathion réduit la solution centinormale d'iode, ce que l'on reconnaît à l'aide d'une solution d'empois d'amidon.

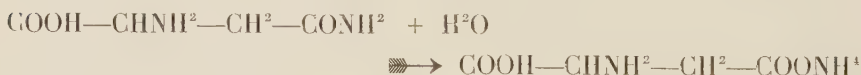
Le Sauton stérile est sans action sur l'iode. Un Sauton ensemencé depuis 7 ou 14 jours avec le B.C.G. a, au contraire, une action assez nette. Il faut 3 gouttes d'iode $\frac{n}{100}$ pour avoir la coloration bleue avec 10 cm³ de Sauton (1 cm³ d'iode à $\frac{n}{100}$ correspond à 2,5 millig. de glutathion).

Le Sauton contiendrait donc 0,062 g. de glutathion par litre vers le 14^e jour de la culture. Ce glutathion disparaît ensuite.

J'ai de même essayé sur les Sautons une réaction signalée par Fabre et Randouin pour caractériser le glutathion (15).

Le liquide de Sauton est additionné d'un volume égal d'acide trichloracétique. Après filtration, le liquide reçoit du nitroprussiate de Na (à 5 %). Puis on ajoute lentement NH⁴(OH). Le glutathion se manifeste par un anneau rouge vers le 14^e jour.

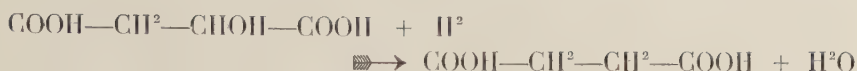
L'asparagine subit une hydrolyse très rapide qui la transforme, avant que la masse microbienne soit importante, en acide aspartique. La réaction d'hydrolyse est alors :



Durant la 2^e semaine de la culture, les microbes du B.C.G. utilisent surtout l'azote aminé. L'acide aspartique se transforme en acide succinique par perte de son groupement aminé. Le processus peut être le suivant. D'abord une hydrolyse :



suivie d'une réduction :



Il faut remarquer que l'asparagine et l'acide succinique servent aussi d'aliment carboné.

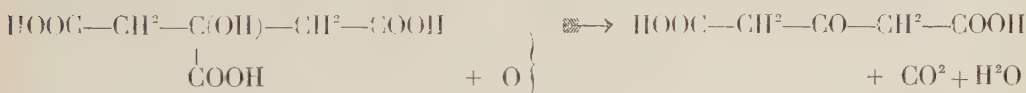
Dans la semaine suivante les microbes utilisent surtout l'azote sous la forme ammoniacale, car il ne reste presque plus d'asparagine ou d'acide aspartique. L'acide succinique disparaît à son tour puisqu'il n'en existe plus dans les cultures de B.C.G. de 4 semaines sur Sauton. Il peut se transformer en acide maléique (signalé par Lobstein), par oxydation.



Puis il y a rupture de la double liaison et finalement formation d'acide oxalique.

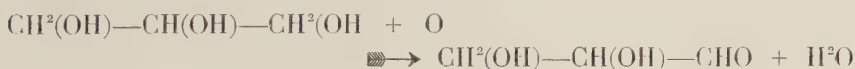
L'acide citrique qui joue le rôle d'aliment carboné doit transitoirement se transformer en formes plus simples. Il y a probablement oxydation de la fonction alcool tertiaire.

Willstätter et Pfannensteil (34) ont montré qu'en présence d'acide sulfurique, l'acide citrique se transforme en acide acétone dicarbonique.



Il y aurait ensuite rupture par oxydation sur le C portant la fonction cétonique.

Reste à envisager la consommation du glycérol. Il sert à la fois d'aliment carboné et d'aliment énergétique. Corps oxydable, on peut envisager la formation probable d'aldéhyde glycérique :



et de dihydroxyacétone (glycérose) :



Peut-être faut-il voir là les produits qui par condensation don-

nent le glucide déjà mentionné. Je dois signaler que la dihydroxyacétone donne seule une osazone avec la méthylphénylhydrazine. Mais si mes Sautons ne contenaient que le glycérose, leur hydrolyse ne pourrait pas me donner ensuite 2 osazones (dont la glucosazone).

L'oxydation continuant, les aldéhydes et cétones obtenus sont transformés en acides. Peut-être par transposition moléculaire se fait-il de l'acide pyruvique ? Je n'ai pas pu le déceler dans mes Sautons, de même que l'acide acétique signalé par certains auteurs (24). Finalement les produits d'oxydation doivent être CO^3 et H^2O . Or, j'ai trouvé de l'acide oxalique. C'est le produit d'une asphyxie (36), due à une insuffisance respiratoire qui s'explique fort bien, d'une part par l'enrichissement en CO^2 de l'atmosphère des ballons, d'autre part par le feutrage de la couche microbienne qui empêche les échanges gazeux.

En résumé, quel que soit le mécanisme de consommation des aliments, de toutes façons, il se forme transitoirement des acides qu'avaient décelés les précipités au mercure et au calcium.

II. — PÉRIODE D'ENTRETIEN MICROBIEN.

Le pH devient de plus en plus acide traduisant un enrichissement en ions H. Il n'y a plus de réactions importantes. Le glycérol consommé ne sert plus que d'aliment énergétique. Mais les échanges gazeux étant réduits, son oxydation complète est difficile. Il est à noter que la courbe de consommation du glycérol a même allure que celle d'apparition du glucide trouvé, ce qui semblerait lier les deux substances par une relation de causalité.

Le liquide de Sauton a repris maintenant un équilibre chimique stable. Enfin au point de vue acide, le Sauton est surtout riche en acide oxalique. Mes dosages d'azote ne peuvent plus s'interpréter en asparagine et acide aspartique, car les protéines du liquide renferment une quantité notable d'azote. On peut admettre comme très probable qu'il n'y a plus du tout d'asparagine ou d'acide succinique.

III^e Partie

CHAPITRE XI

INTERPRÉTATION CHIMIQUE DES SPECTRES D'ABSORPTION

1^o ÉTUDE DE L'ABSORPTION DES CONSTITUANTS DU LIQUIDE DE SAUTON :

Afin d'interpréter les caractères spectraux du Sauton, j'ai examiné les spectres d'absorption des solutions aqueuses saturées de ses constituants, sous une épaisseur de 4 cm.

Pour l'acide citrique, le phosphate bipotassique et le sulfate de magnésium, on observe seulement à partir de 2.800 Å° environ une légère absorption croissant vers les courtes longueurs d'ondes.

L'absorption du glycérol demeure extrêmement faible dans tout le domaine spectral considéré (8.000 à 2.000 Å°). Le citrate de fer ammoniacal est très absorbant dans le visible; sous une épaisseur de 0,5 cm., il présente déjà un seuil d'absorption de 5.800 à 4.850 Å°. L'asparagine donne naissance à une très légère bande 5.300-5.170 Å°), suivie d'une bande plus forte (4.860-4.600 Å°) appartenant au seuil d'absorption qui s'étend ensuite jusqu'à 4.150 Å°.

J'ai étudié ensuite des solutions aqueuses des constituants précédents, avec la concentration même qu'ils ont dans le liquide de Sauton. Les résultats sont analogues à ceux déjà obtenus. Cependant les bandes de l'asparagine (concentration 4 p. 1.000) sont loin d'être affaiblies dans le rapport des concentrations (28 à 1). De plus le citrate de fer ammoniacal à 0,05 p. 1.000 ne devient totalement absorbant qu'à 3.600 Å°.

2° ÉTUDE DU SAUTON :

Le liquide de Sauton non ensemencé a été examiné dans les mêmes conditions que les solutions précédentes. La bande 4.860-4.600 Å de l'asparagine subsiste seule, mais elle est beaucoup plus

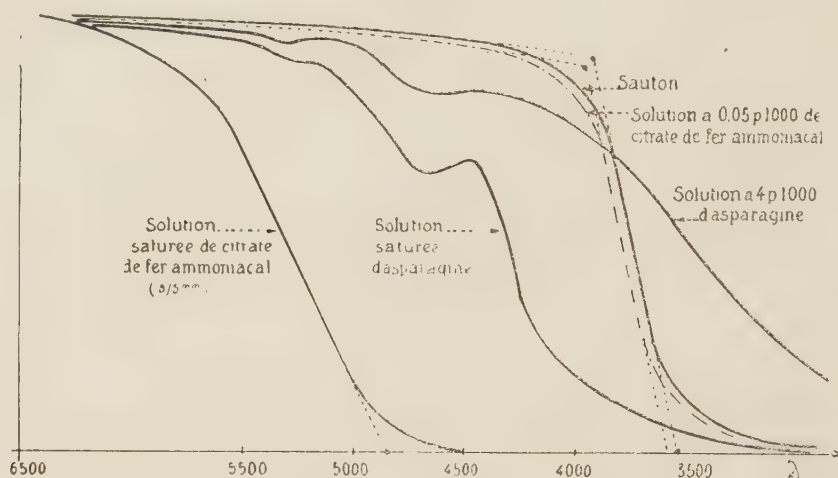


FIG. 14. — Enregistrement du spectre d'absorption de certains éléments du Sauton.

faible que celle que donne la solution à 4 p. 1.000 d'asparagine. Le seuil d'absorption est compris entre 3.920 et 3.550 Å (fig. 14).

3° ÉTUDE DU SEUIL D'ABSORPTION :

Par son aspect sur les diagrammes, il rappelle celui du citrate de fer ammoniacal. Il a en particulier la même pente que celui du citrate, pente qui est 3 fois plus forte que celle du seuil d'absorption de l'asparagine. Le seuil semble bien dû au citrate. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai fait les spectres d'absorption de liquides de Sauton dans lesquels les proportions de citrate sont les suivantes :

	Seuils d'absorption	
1. — Eau distillée		
2. — Sauton sans citrate + 0,010 p. 1.000 de citrate	3800	3400
3. — Sauton sans citrate + 0,025 p. 1.000 de citrate	3850	3450
4. — Sauton normal (à 0,050 de citrate p. 1.000)	3920	3550
5. — Sauton sans citrate + 0,100 p. 1.000 de citrate	4200	3780
6. — Sauton sans citrate + 0,250 p. 1.000 de citrate	4400	4000
7. — Sauton sans citrate + 0,500 p. 1.000 de citrate	4600	4200

Ainsi le seuil d'absorption se déplace en bloc de 800 Å° quand on passe du liquide 2 au liquide 7, c'est-à-dire quand la concentration en citrate passe de 1 p. 100.000 à 50 p. 100.000.

Le Sauton sans citrate présente un seuil d'absorption assez loin dans l'ultra-violet, c'est donc bien le citrate qui crée le seuil d'absorption du liquide de Sauton.

L'absorption totale de ce milieu, qui existe à partir de 3.600 Å°, est évidemment due à la fois au citrate de fer et à l'asparagine, qui possède elle aussi un seuil d'absorption propre, plus loin dans l'ultra-violet que celui du citrate.

1^{re} ÉVOLUTION DU SEUIL D'ABSORPTION AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DU B.C.G. :

Ch. Dhéré a reconnu que l'alcalinisation d'un milieu protéique déplace, en général, la bande d'absorption correspondante du côté le moins réfrangible (37). Depuis, de nombreux chercheurs (38) ont trouvé une liaison entre le pH d'un milieu et son spectre d'absorption. L'évolution du seuil d'absorption semble correspondre à l'évolution du pH des Sautons. Pendant que le milieu devient basique, le pH passant de 7,2 à 7,5, le seuil se déplace vers le rouge selon un effet bathochrome très net, ensuite un effet hypsochrome se produit; le seuil revient vers le violet tandis que le pH devient progressivement acide et tend vers la valeur 6. Ces déplacements du seuil ne sont pas dus à des variations de concentration de l'ion fer du citrate. En effet, des dosages colorimétriques de ce métal montrent que sa concentration reste sensiblement constante au cours de la culture du B.C.G. Il faut donc admettre l'apparition de substances provisoires, créées par la vie microbienne, qui sont responsables du déplacement du seuil d'absorption.

Selon A. Hantzsch et Scharf (89), le sel ou l'éther-sel des acides gras organiques absorbent plus que les acides eux-mêmes. On peut admettre que l'asparagine ou ses produits de transformation : l'acide aspartique et l'acide succinique neutralisent progressivement leurs fonctions acides au cours des 3 premières semaines de la culture du B.C.G.

Les autres acides libres du Sauton font de même. Les seuils d'absorption des sels fermés finissent par être plus loin vers le rouge que celui du citrate de fer ammoniacal. Le Sauton a alors

pour seuil d'absorption celui qui est créé par ces sels. Je rappelle qu'au moment où le seuil est le plus déplacé vers le rouge, le pH du milieu indique un liquide nettement basique.

Puis, la culture microbienne continuant à se développer, l'acide aspartique, l'acide succinique sont détruits, il se forme par oxydation du milieu d'autres acides libres, l'acide oxalique par exemple; le pH devient progressivement égal à 6 (milieu acide). Le Sauton ne contient plus d'éthers-sels absorbants, le seuil d'absorption redevient celui du citrate de fer ammoniacal dont la concentration est restée sensiblement la même au cours du développement microbien.

On peut remarquer d'ailleurs que dans les vieux Sautons, la concentration de certains ions, après avoir passé par un minimum, tend à redevenir ce qu'elle était dans les Sautons neufs (cas des ions SO^4 et PO^4).

La vie microbienne a créé une sorte de déséquilibre chimique. Dès qu'elle s'arrête, le seuil d'absorption, les concentrations des ions SO^4 et PO^4 tendent à redevenir ce qu'ils étaient initialement.

5° ÉTUDE DE L'ASPARAGINE :

Celle-ci engendre successivement sous l'influence de la vie microbienne les acides aspartique et succinique. J'ai, par suite, étudié sommairement les spectres d'absorption des acides suivants en solution aqueuse à 4 p. 1.000 :

1° asparagine	$\text{COOH}-\text{CH}^2-\text{CHNH}^2-\text{CONH}^2$
2° acide aspartique	$\text{COOH}-\text{CH}^2-\text{CHNH}^2-\text{COOH}$
3° acide succinique	$\text{COOH}-\text{CH}^2-\text{CH}^2-\text{COOH}$
4° acide maléique	$\text{COOH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$

(Acides optiquement inactifs de Merck.)

Ces acides donnent des solutions aqueuses incolores, qui présentent cependant une très légère absorption de 8.000 à 5.000 Å. L'absorption devient nette de 4.860 à 4.600 Å pour l'asparagine et l'acide aspartique qui présentent ensuite un seuil d'absorption. L'étude de la bande 4.860-4600 au grandissement 18, avec le microphotomètre de Chalonge, montre l'existence de très légères cannelures (fig. 15). Ceci est à rapprocher des systèmes des bandes

étroites signalées par Vlès et Prager par exemple, dans la bande protéique de 2.780 A° (40).

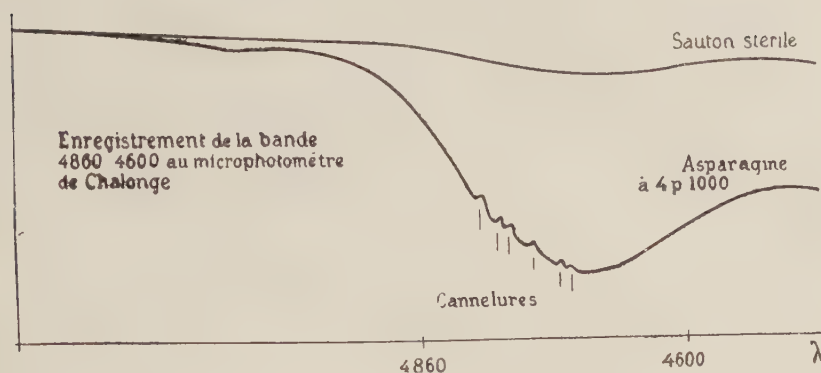


FIG. 15. — Enregistrement de la bande 4.860-4.600 au microphotomètre de Chalonge.

La bande 4.860-4600 est peut-être l'aboutissant dans le visible d'une série de bandes de l'infra-rouge. Chaque cannelure représentant une harmonique des bandes infra-rouges.

Erwin Heintz (41) qui a étudié l'acide aspartique dans l'infra-rouge a trouvé que cet acide possède une faible bande vers 37.500 A° correspondant à $\text{N} =$, une autre beaucoup plus forte vers 33.500 A° correspondant à $\text{N} =$ et à la liaison $\text{C} = \text{O}$ des groupements acides.

Bell (42) et Salant (43) ont trouvé de même que chez toutes les amines primaires il existe deux bandes caractéristiques correspondant à la région $28.000-35.000 \text{ A}^\circ$. Ils ont observé les harmoniques 14.900 à 15.000 A° et 10.300 à 10.600 A° . Ces bandes sont très faibles chez les amines secondaires et disparaissent chez les amines tertiaires. Au total la bande 4.860-4.600 pourrait être due à la fois au groupement amine primaire et aux groupements acides en position γ .

L'acide succinique, qui n'a plus le groupement amine, aurait par suite, comme je l'ai observé, une bande bien plus faible que l'asparagine et l'acide aspartique.

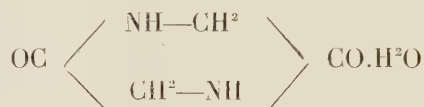
Quant à l'acide maléique, il ne présente pas de bande dans cette région.

6° ÉVOLUTION DE LA BANDE 4.860-4.600 :

Cette bande reste encore fort intense alors que la concentration de l'asparagine passe de 28 à 1.

Selon J. Martinet (44), la salification du groupe aminogène NH^2 qui transforme l'atome d'azote en azote saturé « annihile le pouvoir de l'auxochrome NH^2 ». On peut envisager une cyclisation de l'asparagine dans ses solutions aqueuses. Conformément à la théorie d'Abderhalden sur les protides (45), il y aurait alors en solution 2 formes d'asparagine :

- la forme normale $\text{COOH}-\text{CH}^2-\text{CHNH}^2-\text{CONH}^2$ et
- une forme cyclopeptidique du type :



La dilution détruirait les cycles et augmenterait donc dans la solution l'importance relative de la première forme génératrice des 2 bandes.

Restent à expliquer d'autres singularités observées. En présence de phosphate bipotassique ou de citrate de fer ammoniacal, la bande de l'asparagine 4.860-4.600 devient plus intense. On peut admettre que dans ces conditions les formes cycliques sont détruites; les fonctions amine et acide étant libérées, les bandes s'accroissent. Au contraire, en présence du glycérol qui ne peut détruire les cycles, la bande de l'asparagine a la même importance qu'avec l'asparagine seule.

Enfin reste le fait que le Sauton stérile ne présente presque plus de bandes. On peut envisager là un effet de salification complète du groupement aminogène NH^2 . Le Sauton est, en effet, neutre puisque son pH est 7,2. On a observé un effet de dissimulation analogue sur la bande 10.400 $\text{\AA}$ des dérivés ammoniacaux (46). Cette bande, que possèdent l'hydrazine et l'hydroxylamine, n'existe plus chez leurs chlorhydrates, où l'azote est devenu tétracoordonné. On peut admettre, de même, une tétravalence de l'atome d'azote aminé de l'asparagine, l'amine, dans le Sauton, ayant fixé une fonction acide. La bande 4.860-4.600 est alors très faible puisqu'elle n'est plus due qu'aux groupements acides en position γ . Au

cours de la culture microbienne l'asparagine s'hydrolyse très rapidement en acide aspartique. Le milieu devenant basique, le groupement amine est libéré, la bande correspondante apparaît. Elle ma-

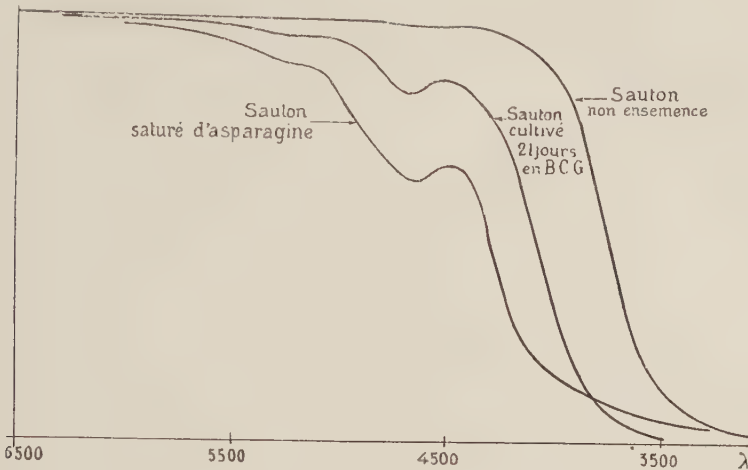


FIG. 16. — Correspondance de la bande observée dans le Sauton avec la bande de l'asparagine.

nifeste la présence de l'acide aspartique dans le milieu. Puis le groupement aminé se détruit à son tour en fournissant son azote aux microbes. La bande correspondante disparaît. Ainsi peut s'expliquer l'apparition temporaire de la bande 4.860-4.600 Å dans les Sautons ensemencés avec le B.C.G. (fig. 16).

7° ESSAI DE JUSTIFICATION DES THÉORIES PRÉCÉDENTES :

Espérant isoler des substances créées par les microbes B.C.G. j'ai traité des Sautons cultivés, puis filtrés, par divers solvants organiques. Le benzène m'a donné des résultats intéressants.

Ce carbure d'hydrogène est transparent dans le domaine étudié de 6.000 à 3.500 Å; or, après traitement du Sauton, il présente un seuil d'absorption. Ce dernier subit les mêmes déplacements que le seuil d'absorption du Sauton. De plus la bande 4.860-4.600 apparaît très légèrement sur le benzène, ayant traité une culture de 3 semaines de B.C.G. en Sauton. Tout ceci s'explique par une solubilité des éléments du Sauton dans le benzène.

Après traitement au benzène, la culture de 7 jours en Sauton du B.C.G. présente la bande 4.860-4.600. Cette bande s'observe aussi sur des cultures de 14, 21, 28 jours, mais elle s'affaiblit progressivement. Le benzène qui dissout divers acides du Sauton a détruit les liaisons tétracoordonnées de l'azote aminé, faisant apparaître par suite la bande correspondante. Puis cette bande disparaît en même temps que l'azote aminé dans les Sautons cultivés de plus en plus longtemps.

Le traitement au benzène semblé donc confirmer les théories proposées.

Conclusion

J'ai appliqué la méthode des spectres d'absorption au liquide de Sautonensemencé avec le B.C.G. Le spectre d'absorption subit une évolution caractéristique au cours du développement microbien.

Généralisée à d'autres espèces microbiennes, vivant sur d'autres milieux de culture, la méthode m'a semblé spécifique de chaque espèce microbienne, à condition d'étudier l'absorption au moment où le développement microbien est le plus intense. La méthode spectroscopique peut ainsi avoir un certain intérêt pour le diagnostic de certaines variétés microbiennes, comme je l'ai montré avec Et. Burnet (9) pour les *Brucellas*.

J'ai essayé enfin d'interpréter l'évolution spectroscopique en fonction de l'évolution chimique. Cette dernière présente en elle-même un certain intérêt puisqu'on l'a, jusqu'à présent, assez rarement étudiée par une méthode analytique.

L'étude précédente gagnerait à être reprise et généralisée. Au point de vue spectroscopique, il serait intéressant d'étudier des microbes modifiant beaucoup la couleur de leur milieu de culture.

Au point de vue chimique, l'étude par exemple de tous les bacilles tuberculeux, humain, bovin, etc..., cultivés sur Sauton, présenterait un intérêt certain, de même que l'étude comparative de toutes les variétés (atténuées ou non) d'une espèce microbienne donnée.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) G. DÉJARDIN et Mlle R. SCHWEIGLER. — Répartition de l'énergie dans les spectres continu et ultra-violet de la molécule d'hydrogène et du cratère positif de l'arc entre électrodes de carbone — *Rev. d'optique*, 13 (1934), 313-330 et 353-374.
- (2) J. F. THOVERT. — Microdensimètre enregistreur rapide — Édition de la *Rev. d'optique*. Paris, 1934.
- (3) D. CHALONGE. — Microphotomètre enregistreur — Édition de la *Rev. d'optique*. Paris, 1938.
- (4) C. SAUTON. — *C. R. Ac. Sc.* 155, 1919, p. 860.
- (5) V. VOLTERRA. — Leçons sur la théorie mathématique de la lutte pour la vie — Gauthier-Villars, Paris, 1931.
- V. VOLTERRA et D'ANCONA. — Les associations biologiques au point de vue mathématique — Hermann, Paris, 1935.
- (6) V. A. KOSTITZIN. — Biologie mathématique — Armand Colin, Paris, 1937.
- (7) G. F. GAUSE. — The struggle for existence — Williams, Baltimore, 1934.
- (8) J. DEBIESSE. — *C. R. Ac. Sc.*, 207 (1938), 1199, 1201.
- (9) E. BURNET et J. DEBIESSE. — *C. R. Ac. Sc.*, 206 (1938), 1328-1330.
- (10) J. DEBIESSE. — *C. R. Ac. Sc.*, 205 (1937), 656-658.
- (11) J. POST et B. NEUMANN. — Traité d'analyse chimique, I, pp. 167-183 — A. Hermann, Paris.
- (12) LOEBEL, SIEMER et RICHARDSON. — *Tran. Nat. Tuberc. Assoc.*, 26-196 (1930) cités p. 193 dans : l'Infection bacillaire et la tuberculose, A. Calmette — Masson, Paris.
- (13) RONCHÈSE. — Guide pratique pour l'analyse des urines, p. 161 — Maloine, Paris.
- (14) A. FROUIN et Mlle GUILLAUME. — *C. R. Soc. Biol.*, 94 (1926), 1340. (1926).
- (15) G. DENIGÈS. — Précis de chimie analytique, I, p. 232 — Maloine, Paris.
- (16) *Ibidem*, p. 682.
- (17) LABORDE, cité dans : Traité de microbiologie, E. Duclaux, Masson, Paris, p. 374-375.

(18) PHILIBERT et BOUDIN. — *Bull. Soc. des études scientifiques sur la tuberculose*, I (1913), 1.

(19) A. FROUIN et Mlle GUILLAUME. — *C. R. Soc. Biol.*, 94 (1920), 1340. (1920).

(20) G. BERTRAND. — *Ann. des fermentations*, IV (1938), 183-184.

(21) MAQUENNE, cité dans le Supplément du dictionnaire de chimie, Wurtz, II (1892), 380.

(22) NESSLER, cité dans : Précis de chimie analytique, G. Denigès, I, 65.

(23) PRIANICHNIKOV. — Albuminoïdes 2. *Académie de l'Etat, Leningrad*, 1926-II.

(24) E. LOBSTEIN. — Recherches biochimiques sur le bacille tuberculeux. Thèse Doct. ès-Sc. nat., Strasbourg, 1922, p. 64.

(25) E. A. SYM. — Der Stickstoffumsatz der Tuberkelbazillen (Métabolisme azoté du bacille tuberculeux) — *Acta Biologica Experimentalis*, XI-1937, 14.

(26) G. SANDOR. — Problème physico-chimique de la tuberculine — *Ann. Inst. Pasteur*, LVII (1936), 565-582.

(27) MESTREZAT. — *C. R. Ac. Sc.*, 143 (1906), 186.

(28) N. WATTIEZ et F. STERNON. — Chimie végétale, Masson, Paris, 1937, p. 261.

(29) M. POLONOVSKI et A. LESPAGNOL. — Chimie organique biologique — Masson, Paris, 1934.

(30) G. BERTRAND, cité ouvrage précédent p. 107.

(31) SACHS, KNOPS, STOHMANN et NOBBE, cités dans la Thèse de E. Lobstein, p. 2.

(32) BAUDRAN. — *C. R. Ac. Sc.*, CXLIX (1909), 874; CI (1910), 1200.

(33) M. SCHOEN. — Le rôle des phosphates dans le processus de fermentation — *Bull. Soc. Chimie Biol.*, II (1929), 819.

(34) MARJORY STEPHENSON. — Bacterial metabolism. Monographs on biochemistry, Plumner et Hopkins, Londron, 1930, p. 76.

(35) P. THOMAS. — Manuel de biochimie — Masson, Paris, 1936, p. 561.

(36) SCHOEN. — Problèmes de spécificité dans les processus de fermentation — *Ann. Inst. Pasteur*, XLVII (1931), 690.

(37) CH. DNIÉRÉ. — Recherches spectrographiques sur l'absorption des rayons ultra-violetes par les albuminoïdes, les protéines et leurs dérivés — Thèse Sc. Nat., Paris, 1909.

(38) F. VLÈS et M. GEX. — Sur les modifications des corps organiques dépendant du pH et sur la représentation mathématique des fonctions qui relient les rapports d'absorption au pH — *Arch. Phys. Biol.*, VI (1927), 69.

(39) Cité par Mme P. RAMART-LUCAS. — *Traité de chimie organique* publié par V. Grignard, Masson, Paris, t. II, p. 120.

(40) F. VLÈS et M. PRAGER. — Sur la structure ultra-violette de certaines substances protéiques — *Arch. Phys. Biol.*, X (1932), 1-16.

(41) ERWIN HEINTZ. — Contribution à l'étude du spectre d'absorption infra-rouge des protides — *Arch. Phys. Biol.*, XIV (1937), 1-100.

(42) J. BELL. — *Am. Chem. Soc.*, 50 (1928), 2940.

(43) SALANT. — *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1926, 12-74, et *Nature* (Londres), 1928, 119, 926.

(44) J. MARTINET. — *Traité de chimie organique* publié par V. Grignard — Masson, Paris, t. II, p. 693.

(45) E. ABDERHALDEN. — *Ztschr. für Physikalchemie*, 37 (1902), 495; 46 (1903), 194; 139 (1924), 181.

(46) Mme C. FREYMANN, MM. R. FREYMANN et P. RUMPF. — *C. R. Ac. Sc.*, 201 (1935), 606-608.

PLANCHE

Spectrogrammes obtenus avec l'appareil de Fery :

- | | | |
|---|---|----------------------------|
| 1 | : | Sauton stérile |
| 2 | : | — ensemené depuis 21 jours |
| 3 | : | — — — — — |
| 4 | : | — — — 42 — |



1.
2.
3.
4.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ :

Spectres d'absorption des vitamines

VU ET APPROUVÉ :

Le Doyen de la Faculté des Sciences de Lyon,
R. DOUIN.

LU ET ACCEPTÉ :

Les Membres du Jury,

MM. L. MEUNIER,
H. CARDOT,
G. DÉJARDIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Lyon, le 6 Mai 1939

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université,
A. LIRONDELLE.

